

AUFKLÄRUNG DER PRIMÄRSTRUKTUR
DER Cu-Zn-SUPEROXID-DISMUTASE
DES SCHWEINES UND DER HEFE
PHYLOGENETISCHER VERGLEICH
DER Cu-Zn-SUPEROXID-DISMUTASEN
VON VERSCHIEDENEN LEBEWESSEN

Karin Hering

*Diss.
München
1986*

Aus dem Forschungszentrum der Grünenthal GmbH, Aachen

Forschungsleiter: Prof. Dr. L. Flohé

vorgelegt über Prof. Dr. K. Tempel

Aus dem Institut für Pharmakologie, Toxikologie und
Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. R. Schulz

AUFKLÄRUNG DER PRIMÄRSTRUKTUR DER

Cu-Zn-SUPEROXID-DISMUTASE DES SCHWEINES UND DER HEFE

PHYLOGENETISCHER VERGLEICH DER Cu-Zn-SUPEROXID-DISMUTASEN

VON VERSCHIEDENEN LEBEWESSEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Karin Hering
aus
Aachen

München 1985

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. K. Tempel

Korreferent: Prof. Dr. H. P. Jennissen

Tag der Promotion: 28. Februar 1986

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1.	<u>PROBLEMSTELLUNG</u>	1
2.	<u>EINLEITUNG</u>	2
2.1	Enzymatische Funktion der Cu-Zn-SOD.....	2
2.2	Entdeckung der SOD.....	4
2.3	Vorkommen von O_2^- -Radikalen bei physiologischen und pathophysiologischen Prozessen und therapeutischer Einsatz von SOD.....	7
3.	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	10
3.1	Reagenzien.....	10
3.2	Dodecylsulfat-Na-salz Polyacrylamidgel- Elektrophorese.....	14
3.3	Enzymatische Aktivität der SOD.....	17
3.3.1	Cytochrom-C-Reduktionstest.....	17
3.3.2	Pyrogalloltest.....	18
3.4	Reduktion, S-Carboxymethylierung.....	19
3.5	Aminosäurenanalysen.....	21
3.5.1	Hydrolyse der Proteine und Peptide.....	23
3.6	Trennung und Nachweis von Peptiden mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie.....	24
3.7	C-terminale Sequenzanalyse.....	25
3.8	Spaltungen.....	27
3.8.1	Spaltung mit Bromcyan.....	27
3.8.2	Spaltung mit Trypsin.....	27
3.8.3	Spaltung mit Staphylokokkus aureus Proteinase V8...	28
3.8.4	Spaltung mit Hydroxylamin.....	29
3.9	Trennung der Spaltpeptide.....	29
3.9.1	Trennung der Peptide aus der Spaltung mit Bromcyan.	29
3.9.2	Trennungen der Peptide aus den Spaltungen mit Trypsin, Staphylokokkus aureus Proteinase V8 oder Hydroxylamin.....	30
3.10	Sequenzanalyse.....	30
3.10.1	Automatischer Edman-Abbau mit einem Festphasensequenator.....	30

3.10.2	C-terminale Peptidanbindung an Aminopropylglas.....	34
3.10.3	Nachweis und Identifizierung der PTH-Aminosäuren...	35
4.	<u>ERGEBNISSE</u>	37
4.1	<u>Schweine-Cu-Zn-SOD</u>	37
4.1.1	Charakterisierung des Ausgangsmaterials.....	37
	Reinheit und relative Molekülmasse.....	37
	Enzymatische Aktivität.....	39
	UV-Absorptionsspektrum.....	40
	Aminosäurezusammensetzung der Schweine-Cu-Zn-SOD..	40
4.1.2	N-Terminus der Schweine-Cu-Zn-SOD.....	43
4.1.3	C-Terminus der Schweine-Cu-Zn-SOD.....	44
4.1.4	Spaltungen und Sequenzierungsstrategie.....	45
4.1.5	Bromcyan-Peptide.....	46
4.1.6	Tryptische Peptide.....	49
4.1.7	Peptide der Spaltung mit Staphylokokkus aureus Proteinase V8.....	57
4.1.8	Primärstruktur der Schweine-Cu-Zn-SOD.....	59
4.2	<u>Hefe-Cu-Zn-SOD</u>	61
4.2.1	Aminosäurezusammensetzung der Hefe-Cu-Zn-SOD.....	61
4.2.2	N-Terminus der Hefe-Cu-Zn-SOD.....	62
4.2.3	Spaltungen und Sequenzierungsstrategie.....	63
4.2.4	Tryptische Peptide.....	63
4.2.5	Hydroxylaminspaltung.....	70
4.2.6	Primärstruktur der Hefe-Cu-Zn-SOD.....	73
5.	<u>DISKUSSION</u>	75
5.1	Schweine-Cu-Zn-SOD.....	75
5.2	Hefe-Cu-Zn-SOD.....	78
5.3	Phylogenetische Betrachtung.....	79
6.	<u>ZUSAMMENFASSUNG, SUMMARY</u>	88
	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	90

Erklärung der verwendeten Abkürzungen

Aminosäuren:

Ala	- A -	Alanin
Arg	- R -	Arginin
Asn	- N -	Asparagin
Asp	- D -	Asparaginsäure
Asx		Asparagin oder Asparaginsäure
Cys	- C -	Cystein
Gln	- Q -	Glutamin
Glu	- E -	Glutaminsäure
Glx		Glutamin oder Glutaminsäure
Gly	- G -	Glycin
His	- H -	Histidin
Hse + Hse		Homoserin und Homoserin Lakton
Ile	- I -	Isoleucin
Leu	- L -	Leucin
Lys	- K -	Lysin
Met	- M -	Methionin
Phe	- F -	Phenylalanin
Pro	- P -	Prolin
Ser	- S -	Serin
Thr	- T -	Threonin
Trp	- W -	Tryptophan
Tyr	- Y -	Tyrosin
Val	- V -	Valin

A	- Absorption
Ac	- Acetyl
As	- Aminosäure
ATZ	- Anilinothiazolinon
Bq	- Becquerel, Einheit für die radiologische Aktivität
CB	- Bezeichnung für Peptide, die bei der Spaltung mit Bromcyan erhalten werden
C'Pase A	- Carboxypeptidase A
C'Pase B	- Carboxypeptidase B
Cu-Zn-SOD	- Kupfer- und Zink-haltige SOD
E	- Bezeichnung für Peptide, die bei der Spaltung mit Staphylokokkus aureus Proteinase V8 erhalten werden
Fe-SOD	- Eisen-haltige SOD
Mn-SOD	- Mangan-haltige SOD
PITC	- Phenylisothiocyanat
PTC	- Phenylthiocarbonyl
PTH	- Phenylthiohydantoin
RCM	- reduziert, S-carboxymethyliert
RP HPLC	- (<u>R</u> everse- <u>p</u> hase <u>h</u> igh <u>p</u> ressure <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography) Umkehr-Phasen Hochdruckflüssigkeitschromatographie
SOD	- Superoxid-Dismutase
T	- Bezeichnung für Peptide, die bei der Spaltung mit Trypsin erhalten werden
TFA	- Trifluoressigsäure
Tos Phe CH ₂ Cl	- mit (N-Tosyl-L-phenylalanyl)-chloromethan behandelt

Die Primärstrukturen der Cu-Zn-SOD folgender Spezies wurden in der vorliegenden Arbeit zur phylogenetischen Betrachtung herangezogen:

Mensch	(<i>Homo sapiens</i>) /18/
Schwein	(<i>Sus scrofa domesticus</i>) /diese Arbeit/
Rind	(<i>Bos taurus</i>) /73/
Pferd	(<i>Equus caballus</i>) /40/
Ratte	(<i>Rattus norvegicus</i>) /68/
Schwertfisch, Florida	(<i>Xiphias gladius</i>) /58/
Fruchtfliege	(<i>Drosophila melanogaster</i>) /39/
Kohl	(<i>Brassica oleracea</i>) /68/
Hefe	(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) /diese Arbeit, 33/
<i>P. leiognathi</i>	(<i>Photobacterium leiognathi</i>) /67/

1. PROBLEMSTELLUNG

Die Superoxid-Dismutase (SOD) spielt eine entscheidende Rolle bei der Abwehr gegen oxidative Zellschädigung infolge freigegebener O_2^- -Radikale in entzündetem Gewebe und im Gewebe nach aufgetretener Ischämie. Als Antiphlogistika in der Veterinärmedizin und Humanmedizin haben insbesondere die Superoxid-Dismutasen der Säugetiere Aufsehen erregt. Die Strukturinformation über Superoxid-Dismutasen ist daher nicht nur für theoretische Untersuchungen über Struktur-Aktivitätsbeziehungen oder die Konservierung von essentiellen Aminosäuren wichtig, sondern auch für die Applikation in der Praxis, da bei der Therapie mit heterologen Proteinen deren strukturelle Verwandtschaft das immunologische Risiko mitbestimmen dürfte.

Von der Schweine-Cu-Zn-SOD waren bisher nur marginale Daten bekannt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte diese SOD erstmalig charakterisiert und ihre Primärstruktur eindeutig ermittelt werden. Im Laufe der Untersuchungen ergab sich die Notwendigkeit, eine bei der Schweine-Cu-Zn-SOD beobachtete Heterogenität genauer zu untersuchen. Zusätzlich wurde die Primärstruktur der Hefe-Cu-Zn-SOD untersucht, da man in der Literatur zwei untereinander differierende Primärstrukturen findet. Aufgrund von festgestellten Homologien, sowohl bei den untersuchten als auch bei bereits bekannten Cu-Zn-Superoxid-Dismutasen anderer Spezies, sollten phylogenetische Verwandtschaften bestimmt werden.

2. EINLEITUNG

2.1 Enzymatische Funktion der Cu-Zn-SOD

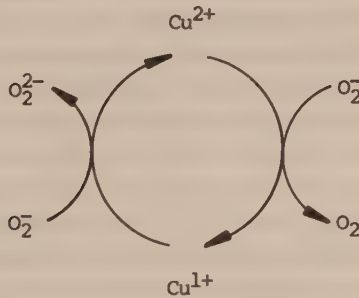
In Sauerstoff metabolisierenden Organismen kann es durch eine Vielzahl von Prozessen zur Bildung von Superoxid-Radikalen (O_2^-) kommen. Die physiologische Regulation zellulärer O_2^- -Konzentration erfolgt einerseits über die Aktivitäten verschiedener zellulärer Bildungsquellen und andererseits über die Elimination durch O_2^- verbrauchende Regulationsschritte. Eine besondere regulatorische Rolle fällt dem Metalloenzym Superoxid-Dismutase zu, welches in der Lage ist, diese O_2^- -Radikale sehr effizient abzubauen /47/. Obwohl auch eine nicht-enzymatische Dismutation von O_2^- -Radikalen vorkommt, welche zu gleichen Reaktionsprodukten führt, ist die Ausstattung der Zelle mit SOD zum Schutz des intrazellulären Raumes außerordentlich wichtig, da die Dismutation mit SOD O_2^- -Radikale mit der größten Geschwindigkeitskonstanten der in Frage kommenden Reaktionen umsetzt. Die Superoxid-Dismutase katalysiert die folgende Reaktion /46/:



Dieses Enzym ermöglicht es den Zellen, ein für sie selbst tödliches Überangebot von O_2^- -Radikalen zu vermeiden. Das Gleichgewicht der Reaktion liegt völlig auf der Seite der Bildung von Wasserstoffperoxid und Sauerstoff. Das bei der Reaktion entstandene Wasserstoffperoxid kann anschließend durch Katalase oder Peroxidasen zu Wasser reduziert werden /7/. Mit SOD ist die Geschwindigkeitskonstante der Dismutationsreaktion etwa 10^4 mal höher als bei der spontan ablaufenden Dismutation. Berücksichtigt man zusätzlich, daß die spontane Dismutation eine Reaktion 2. Ordnung ist und daß die enzymatische Reaktion von 1. Ordnung ist, so kann die enzymatische Dismutation bis zu 10^{10} mal schnell-

ler ablaufen /23/. Die Bildungsgeschwindigkeit der Dismutationsprodukte ist damit so hoch, daß die Reaktion durch die Diffusion der Substrate an das Enzym und weniger durch die Aktivität des Enzyms limitiert ist /60/.

Im Zytoplasma von Säugetieren findet man die Cu-Zn-SOD, für deren enzymatische Aktivität Kupfer und Zink im katalytischen Zentrum essentiell sind /22/. Bei der Rinder-Cu-Zn-SOD, welche am besten untersucht ist, werden je Untereinheit ein Cu und ein Zn von sechs Histidinen und einer Asparaginsäure bekannter Positionen gebunden /56,57/. Die Dismutationsreaktion läßt sich durch Elektronenumlagerung an Kupfer nach folgendem Schema beschreiben.



Das gebildete O_2^{2-} reagiert mit 2H^+ zu H_2O_2 entsprechend folgender Summenformel:



2.2 Entdeckung der SOD

Bereits im Jahre 1938 konnte ein Kupferprotein blauer Färbung aus roten Blutzellen von Säugetieren isoliert werden. Die relative Molekülmasse wurde für dieses Protein zu etwa 35000 Da bestimmt. Aufgrund seines Kupfergehaltes und seiner Lokalisation erhielt es den Namen Haemocuprein /42/. Die Isolierung eines gereinigten Kupferproteins blaugrüner Farbe aus Pferdeleber gelang im Jahre 1953. Es wurde Hepatocuprein genannt /49/. Es folgte im Jahre 1957 die Isolierung eines Kupfer enthaltenden Proteins aus Rindergehirn /52/ und im Jahre 1959 aus menschlichem Gehirn /51/, welches als Cerebrocuprein bezeichnet wurde. In einer Untersuchung im Jahre 1969 wurden identische physikalische, chemische und immunologische Eigenschaften der Metalloproteine dieser drei Gewebe festgestellt. Sie wurden daraufhin Cyto cupreine genannt /9/. Ebenfalls 1969 gelang es, die enzymatische Funktion des Erythro cuprein nachzuweisen (vgl. Abschnitt 2.1). Wegen seiner dismutierenden Aktivität wurde das Enzym Superoxid-Dismutase (SOD) genannt. Das Enzym enthält 0.34 % Kupfer und hat eine relative Molekülmasse von etwa 34000 Da /46/. Die Entdeckung der Enzymfunktion führte in der Folge zur Charakterisierung einer Vielzahl von Superoxid-Dismutasen, die sich nicht nur im Proteinanteil, sondern auch durch das im katalytischen Zentrum gebundene Metallkation unterscheiden.

Heute sind drei Gruppen von Superoxid-Dismutasen bekannt, die nach dem Metallkation im katalytischen Zentrum unterschieden werden. Die Cu-Zn-SOD, für welche die blaugüne Färbung charakteristisch ist, wurde im Zytosol von eukaryontischen Zellen und bei wenigen Bakterien gefunden. Alle diese zytoplasmatischen Enzyme haben eine relative Molekülmasse in der Nähe von 32000 Da, sind ein Dimer mit identischen Untereinheiten und enthalten ein Kupfer- und ein Zinkion pro Untereinheit /45/. Die Primärstrukturen der Cu-Zn-Superoxid-Dismutasen folgender Spezies sind bereits bekannt: Mensch (*Homo sapiens*) /18/, Rind (*Bos taurus*) /73/, Pferd (*Equus caballus*) /40/, Ratte (*Rattus norvegicus*) /68/, Schwert-

fisch (*Xiphias gladius*) /58/, Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) /39/, Kohl (*Brassica oleracea*) /68/, Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) /33,71/ und Photobakterium *leiognathi* /67/. Die Cu-Zn-SOD wurde z.B. auch in *Caulobacter crescentus* gefunden /72/. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Primärstrukturen der Cu-Zn-SOD des Schweines (*Sus scrofa domesticus*) und von Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) untersucht.

Superoxid-Dismutasen, welche Mangan im katalytischen Zentrum besitzen, wurden bei den meisten Prokaryonten, außer bei den Anaerobiern, und bei Eukaryonten gefunden /1/. Bei Eukaryonten ist die Mn-SOD in der Matrix von Mitochondrien lokalisiert /23/. Diese Organellenspezifität wurde z.B. bei der Mn-SOD von Hühnerleber nachgewiesen /78/. Mn-SOD wurde z.B. in *E. coli* /35,70/, *Streptokokkus mutans* /76/ und den Mitochondrien aus Menschenleber /45/ gefunden. Die Mn- und Cu-Zn-SOD können gut unterschieden werden. Die Mn-SOD wird durch Behandlung mit einer Mischung aus Chloroform und Äthanol inaktiviert, während Zyanid die Cu-Zn-SOD, nicht aber die Mn-SOD hemmt /53,60,78/.

Die Fe-SOD wurde zuerst bei *E. coli* gefunden. Man entdeckte hier /53/ eine eisenhaltige SOD von gelber Farbe. Fe-SOD wird bevorzugt in Prokaryonten (z.B. bei *Photobakterium leiognathi* /54/), Protozoa und eukaryontischen Algen gefunden /1/. Diese SOD konnte ebenso bei einigen Pflanzen nachgewiesen werden, wie bei Brassicaceae und Nymphaeaceae und dem Pflanzentier *Euglena gracilis* /55/, und sie scheint auch bei Säugetieren vorzukommen, wie beim Rind im Nebennierenmark /24/.

Die Superoxid-Dismutasen werden nach ihrem Metallgehalt und den festgestellten Ähnlichkeiten der Aminosäuresequenzen untereinander in zwei Klassen eingeteilt. Die Cu-Zn-Superoxid-Dismutasen bilden eine unter sich homologe Klasse. Bei den manganhaltigen Superoxid-Dismutasen handelt es sich um eine homologe Gruppe von Enzymen /45,78/, die sich auch zu den eisenhaltigen Superoxid-Dismutasen als homolog erweisen /53/ und folglich mit diesen zu

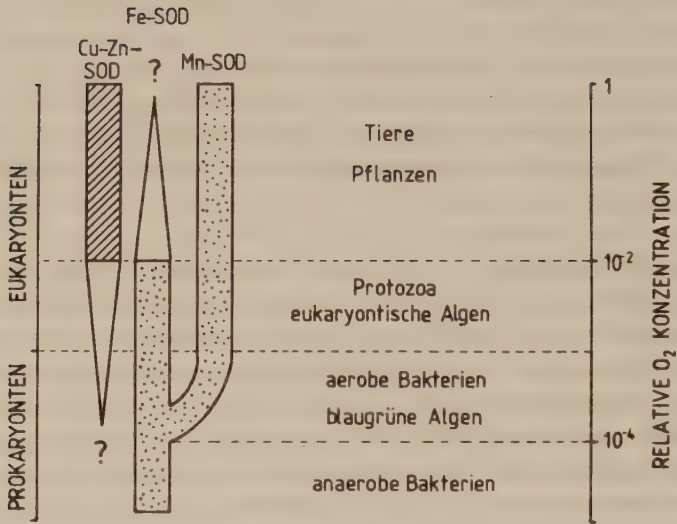


Abb. 2.1: Phylogenetische Ausbreitung der drei vorkommenden Gruppen von SOD nach /1,18/ in wichtigen Organismengruppen bei verschiedenen Stufen der Evolution in Abhängigkeit von der jeweiligen Sauerstoffkonzentration, welche relativ zur jetzigen Konzentration in der Atmosphäre angegeben ist. Die weißen Pfeile wurden aufgrund von SOD Funden in entsprechenden Organismen ergänzt.

einer Klasse zusammengefaßt werden. Zwischen beiden Klassen wurde weder bei der Aminosäuresequenz noch bei der Raumstrukturanalyse eine signifikante Homologie gefunden; die Mn- und Fe-SOD scheinen sich unabhängig von der Cu-Zn-SOD entwickelt zu haben /1,18,23,26/. Abbildung 2.1 zeigt die phylogenetische Ausbreitung der drei vorkommenden Gruppen von SOD in den Organismen bei verschiedenen Stufen der Evolution in Abhängigkeit von der jeweiligen Sauerstoffkonzentration, welche relativ zur jetzigen Konzentration in der Atmosphäre angegeben ist.

Alle drei Gruppen der SOD katalysieren die gleiche Reaktion (vgl. Abschnitt 2.1) mit einer hohen, nahezu identischen katalytischen Aktivität /21,60/. Es ist nicht verwunderlich, daß eine parallele Evolution von Superoxid-Dismutasen in den verschiedenen Organismen, die in der anaeroben Welt existierten, erfolgte. Als auslösend wird der gemeinsame Selektionsdruck der Sauerstoffanreicherung in der Atmosphäre durch die Photosynthese der blaugrünen Algen vor etwa 2×10^9 Jahren betrachtet /22,23/.

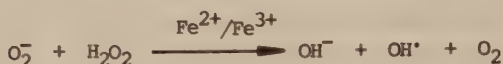
2.3 Vorkommen von O_2^- -Radikalen bei physiologischen und pathophysiologischen Prozessen und therapeutischer Einsatz von SOD

Das Superoxid-Radikal O_2^- ist ein allgemeines metabolisches Zwischenprodukt, welches bei einer Vielzahl von biologischen Oxidationen gebildet wird. Einige Vorgänge, bei welchen dieses Radikal gebildet wird, sind nachfolgend angeführt.

Superoxid-Radikale werden in entzündetem Gewebe /17/, in postischämischem Gewebe /44/ und im Gewebe nach Einwirkung ionisierender Strahlen /74/ gefunden. Sie können ferner durch Autooxidationen, z.B. von Haemoglobin und Myoglobin, reduziertem Flavin, reduziertem Cytochrom-C oder von Hydrochinonen gebildet werden, oder sie werden bei enzymatischen Oxidationen, z.B. mit Xanthin-Oxidase oder Aldehyd-Oxidase, produziert /23/.

Sowohl die Zunahme als auch die Abnahme der O_2^- -Gleichgewichtskonzentration in der Zelle führt zu pathologischen Erscheinungen. Eine zu geringe Konzentration führt zu Ausfällen der verschiedensten biologischen Vorgänge, da einige Reaktionen nur durch einen O_2^- -abhängigen Enzymschritt katalysiert werden /50/. Die Zunahme der Gleichgewichtskonzentration von O_2^- -Radikalen führt zu diversen Zellschädigungen: ungesättigte Fettsäuren werden oxidiert, Membranen zerstört und Zellen getötet. Vieles weist aber darauf hin, daß diese Schädigungen nicht von dem O_2^- -Radikal allein,

sondern vor allem durch seine sehr reaktiven Reaktionsprodukte bewirkt werden. Die gleichzeitige Anwesenheit von Wasserstoffperoxid und Superoxid-Radikalen führt z.B. in einer Übergangsmetall-katalysierten Reaktion zu dem hochreaktiven Hydroxylradikal:



Bezüglich der Zerstörung von Zellstrukturen wird diesem Sekundär-radikal heute größte Bedeutung beigemessen. Es greift Membranlipide, andere essentielle Zellkomponenten und die DNA an /17,23,34/.

Andererseits haben sich Phagozyten spezialisiert und benutzen die Reaktionsfreudigkeit des Superoxid-Radikals zum Abtöten von aufgenommenen Bakterien. Die aktivierten Phagozyten (polymorphkernige Leukozyten, Monozyten und Makrophagen) gelangen durch ihre Fähigkeit zur Chemotaxis in das Gewebe und wandern zur Wunde oder zum Infektionsherd. Die Sauerstoffaufnahme des aktivierten Phagozyten ist etwa um den Faktor 10 verglichen mit dem Ruhestoffwechsel gesteigert. Der bei Aktivierung zusätzlich aufgenommene Sauerstoff wird benutzt, um durch direkte univalente Reduktion O_2^- -Radikale zu bilden. Diese Radikale können in spontaner oder enzymatischer Reaktion zu Wasserstoffperoxid oder weiteren Reaktionsfolgeprodukten, wie z.B. dem Hydroxylradikal und dem Hypochlorid, reagieren. Mit diesen Reaktionsprodukten werden die in den Organismus eingedrungenen und von Phagozyten aufgenommen Bakterien abgetötet. Da aber die Reaktionsprodukte von den Phagozyten entweichen und in den extrazellulären Raum und in das umliegende Gewebe gelangen, kommt es dort zu lokalen Reizungen. Dieser lokale Reiz und eine lokale Aktivierung von Phagozyten könnten sich jedoch nicht zu einer ausgedehnten Entzündungsreaktion auswachsen, würden nicht die Phagozyten selbst durch Abgabe leukotaktischer Faktoren (Leukotaxine) für Nachschub an weiteren zellulären Elementen sorgen, die ihre Wirkung potenzieren. Da in

extrazellulären Flüssigkeiten nur wenig SOD vorhanden ist, welche die O_2^- -Radikale umsetzt, kommt es zur Schädigung des intakten umgebenden Zell- und Bindegewebes. Der Phagozyt selbst ist normalerweise gegen O_2^- -Radikale geschützt, da der intrazelluläre Raum hohe Aktivitäten von SOD, Katalase und Peroxidasen besitzt /19,65/.

Durch enzymatisches Abfangen der O_2^- -Radikale mit injizierter SOD kann die Radikalkettenreaktion unterbunden werden. Die gewebschädigenden Reaktionen werden daraufhin gehemmt, und auch die Selbstverstärkung der Entzündung durch Leukotaxis kann unterbrochen werden. Die SOD ist somit antiphlogistisch wirksam /17/ und kann die bisherigen Behandlungsmethoden sinnvoll ergänzen. Orgotein ist die Drogenform der Rinder-Cu-Zn-SOD, welche therapeutisch in der Veterinär- und Humanmedizin angewendet wird /48/, z.B. bei entzündlich degenerativen und rheumatoiden Gelenkerkrankungen /80/, bei verschiedenen autoimmunologischen Erkrankungen, Behandlung unerwünschter Begleiterscheinungen bei der Strahlentherapie oder der Anwendung von Zytostatika /50/.

Heute werden eine Reihe weiterer Erkrankungen mit Störungen im Sauerstoffradikalkontrollsystem in Verbindung gebracht /50/: z.B. Trisomie 21 (Chromosom 21 trägt den Genort für die Kodierung von zytoplasmatischer SOD /63/), psychiatrische Erkrankungen, Fanconi Anämie, Morbus Parkinson.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Reagenzien

Acetonitril

PIERCE CHEMICAL COMPANY, Rockford, USA, Nr. 20060

Acrylamid, zur Analyse

SERVA FEINBIOCHEMICA Heidelberg, Nr. 10675

Äthanol absolut, zur Analyse

MERCK Darmstadt, Nr. 983

1-Äthyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-HCl (EDC)

SERVA FEINBIOCHEMICA Heidelberg, Nr. 11250

Äthylendiamintetraessigsäure Na₂-Salz (EDTA), zur Analyse

SERVA FEINBIOCHEMICA Heidelberg, Nr. 11280

Albumin aus Hühnerei, reinst

SERVA FEINBIOCHEMICA Heidelberg, Nr. 11840

Albumin aus Rinderserum, reinst

SERVA FEINBIOCHEMICA Heidelberg, Nr. 11920

Ameisensäure, zur Analyse

MERCK Darmstadt, Nr. 264

3 Aminopropylglas (75 Å)

LKB BIOCHROM LTD, Cambridge, England Nr. 4320-206

Ammoniumhydrogenkarbonat, reinst

MERCK Darmstadt, Nr. 1131

Ammoniumpersulfat (APS), zur Analyse

SERVA FEINBIOCHEMICA Heidelberg, Nr. 13375

α-1-Antitrypsin

SIGMA CHEMICAL COMPANY, St. Louis, USA, Nr. A-9024

Biogel P10, 200-400 mesh

BIO RAD LABORATORIES, Richmond, USA

Borsäure, kristallin, zur Analyse

MERCK Darmstadt, Nr. 165

Bromcyan

MERCK-SCHUCHARDT Hohenbrunn, Nr. 820193

Bromphenolblau Na-Salz, wasserlöslich, reinst

SERVA FEINBIOCHEMICA Heidelberg, Nr. 15375

Butanol

MERCK Darmstadt, Nr. 198b

Carboanhydrase, zur Analyse
SERVA FEINBIOCHEMICA Heidelberg, Nr. 15881

Carboxypeptidase A, kristalline Suspension in Wasser
(Peptidyl-L-Aminosäuren-Hydrolase) (EC 3.4.17.1);
SERVA FEINBIOCHEMICA Heidelberg, Nr. 16130

Carboxypeptidase B
(Peptidyl-L-lysin (L-arginin)-Hydrolase) (EC 3.4.17.2);
SERVA FEINBIOCHEMICA Heidelberg, Nr. 16135

Coomassie^R Brillant Blau R-250
MERCK Darmstadt, Nr. 12553

Cu-Zn-SOD vom Rind (Peroxinorm^R)
GRÜNENTHAL GmbH, Stolberg

Cu-Zn-SOD aus *Saccharomyces cerevisiae*
P. SCHWERTNER, GRÜNENTHAL GmbH, Stolberg

Cu-Zn-SOD vom Schwein
A.M. MICHELSON, FONDATION EDMOND DE ROTHSCHILD, Paris

Cytochrom-C, reinst
SERVA FEINBIOCHEMICA Heidelberg, Nr. 18020

Diäthylentriaminpentaessigsäure (Fotopur^R)
MERCK Darmstadt, Nr. 10642

1,2-Dichloräthan
MERCK Darmstadt, Nr. 953

2,2 Dihydroxyindan-1,3-dion (Ninhydrin), zur Analyse
MERCK Darmstadt, Nr. 6762

N. N. Dimethylformamid
MERCK Darmstadt, Nr. 2937

Dodecylsulfat Na-Salz, kristallin, reinst
SERVA FEINBIOCHEMICA Heidelberg, Nr. 20760

Essigsäure 100%ig, zur Analyse
MERCK Darmstadt, Nr. 63

Essigsäureäthylester, zur Analyse
MERCK Darmstadt, Nr. 853

Festphasen-Sequenzierpuffer I
N-Methylmorpholin-Trifluoressigsäure in Pyridin (2:3 (V/V)) pH 8.1
PIERCE CHEMICAL COMPANY, Rockford, USA, Nr. 20104

Washed Glass Beads (gewaschenes Glas)
LKB BIOCHROM LTD, Cambridge, England, Nr. 4320-215

Glutamin

Satz der 20 natürlichen Protein-Aminosäuren, AS 30
PIERCE CHEMICAL COMPANY, Rockford, USA, Nr. 39003

Glycin, zur Analyse

SERVA FEINBIOCHEMICA Heidelberg, Nr. 23390

Guanidinhydrochlorid, reinst

FLUKA FEINCHEMIKALIEN GmbH, Neu-Ulm, Nr. 51030

Harnstoff, zur Analyse

SERVA FEINBIOCHEMICA Heidelberg, Nr. 24524

Hydroxylamin-HCl

SERVA FEINBIOCHEMICA Heidelberg, Nr. 25513

Jodessigsäure, zur Analyse

MERCK Darmstadt, Nr. 374

(2-¹⁴C) Jodessigsäure

2.07 GBq/mmol

AMERSHAM BUCHLER GmbH & Co KG Braunschweig, Nr. CFA 269

Kaliumkarbonat, zur Analyse

MERCK Darmstadt, Nr. 4928

Kaliumphosphat, zur Analyse

SERVA FEINBIOCHEMICA Heidelberg, Nr. 26870

Magnesiumchlorid, zur Analyse

MERCK Darmstadt, Nr. 5833

2-Merkaptoäthanol, reinst

SERVA FEINBIOCHEMICA Heidelberg, Nr. 28625

Methanol, zur Analyse

MERCK Darmstadt, Nr. 6002

N,N'-Methylen-bis-acrylamid (Bisacrylamid)

FLUKA AG, CH-Buchs, Nr. 66669

Methylmorpholin

MERCK Darmstadt, Nr. 805894

Natriumacetat, wasserfrei

MERCK Darmstadt, Nr. 6268

Tri-Natriumcitrat 2-hydrat

MERCK Darmstadt, Nr. 6430

Natriumhydroxid-Plättchen, reinst

MERCK Darmstadt, Nr. 6482

Pentachlorphenol, zur Synthese

MERCK-SCHUCHARDT Hohenbrunn, Nr. 807042

Phenylisothiocyanat (PITC)

PIERCE CHEMICAL COMPANY, Rockford, USA, Nr. 26922

Propionsäure-tertiärer-butylester

FLUKA AG, CH-Buchs, Nr. 81960

PTH-Aminosäuren-Standard-Satz

PIERCE CHEMICAL COMPANY, Rockford, USA, Nr. 27300

Pyridin

PIERCE CHEMICAL COMPANY, Rockford, USA, Nr. 25114

Pyrogallol, zur Analyse

SERVA FEINBIOCHEMICA Heidelberg, Nr. 34048

Quickzint^R 212

ZINSSER ANALYTIC GmbH, Frankfurt, Nr. 1007600

Salzsäure rauchend, zur Analyse

MERCK Darmstadt, Nr. 317

Sephadex^R G25

PHARMACIA FINE CHEMICALS, Uppsala, Schweden, Nr. 17-0032-01

Staphylokokkus aureus Proteinase V8

(strain V8 serine proteinase) (EC 3.4.21.19)

MILES SCIENTIFIC, Naperville, USA, Nr. 39-900

N,N,N,N'-Tetramethyl-äthylendiamin (TEMED), reinst

SERVA FEINBIOCHEMICA Heidelberg, Nr. 35925

2,2 Thiodiäthanol, zur Analyse

MERCK Darmstadt, Nr. 8174

Trifluoressigsäure

LKB BIOCHROM LTD, Cambridge, England, Nr. 4320-219

2,4,6-Trimethylpyridin (Kollidin), zur Analyse

MERCK Darmstadt, Nr. 2635

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), zur Analyse

SERVA FEINBIOCHEMICA Heidelberg, Nr. 37180

Trypsin (EC 3.4.21.4)

mit (N-Tosyl-L-phenylalanyl)-chloromethan behandelt

MERCK Darmstadt, Nr. 24581

Xanthin Na-Salz (Xanthin), zur Analyse

SERVA FEINBIOCHEMICA Heidelberg, Nr. 38422

Xanthin-Oxidase

SERVA FEINBIOCHEMICA Heidelberg, Nr. 38418

Zitronensäure l-hydrat, zur Analyse

MERCK Darmstadt, Nr. 244

3.2 Dodecylsulfat-Na-salz Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die Dodecylsulfat-Na-salz (SDS)-Polyacrylamidgel-Elektrophorese wird nach /3,38,62,77/ durchgeführt. Zu 10-25 µg des zu untersuchenden Proteins wurden im Volumenverhältnis 1:1 SDS Probenpuffer (Tab. 3.2) hinzugegeben. Nach Zugabe von 5 µl Merkaptoäthanol wird die Proteinlösung für 2 min auf 90 °C erhitzt. Zur Markierung der Lösung wird 1 µl Bromphenolblau-Lösung (Tab. 3.2) hinzugefügt. Die hergestellte Lösung wird neben einer Mischung aus verschiedenen bekannten Referenzsubstanzen (Tab. 3.1) auf das vorher hergestellte Polyacrylamidgel (16x18x0.2 cm) aufgetragen. Bei einer Stromstärke von 60 mA wird die Gelelektrophorese in einem Laemmli-Elektrophoresepuffer (Tab. 3.2) entwickelt. Zur besseren Auswertbarkeit und Haltbarkeit wird das Gel für 45-60 min mit Entfärberlösung, bestehend aus 20 % Äthanol und 6.05 % Essigsäure in H₂O, entfärbt und fixiert. Anschließend wird es für 90 min in Färbelösung, bestehend aus 25 % Äthanol, 0.25 % Coomassie^R Brilliant Blau R-250 und 8 % Essigsäure in H₂O, gefärbt. Während des Färbens und Entfärbens muß das Gel ständig bewegt werden und vollständig von diesen Lösungen bedeckt sein. Mit Entfärberlösung wird das Gel so lange behandelt, bis der Untergrund farblos ist und nur noch die blauen Banden des Proteins und der Referenzsubstanzen sichtbar sind.

Tab. 3.1: Referenzsubstanzen

Name	relative Molekülmasse je Untereinheit	Menge (µg)
Albumin aus Rinderserum	67000	10
Albumin aus Hühnerei	45000	10
Carboanhydrase	29000	10
Antitrypsin	21000	10
Cytochrom-C	12400	5

Trägt man die relative Molekülmasse der unter gleichen Bedingungen aufgetrennten Referenzsubstanzen halblogarithmisch gegen die Wanderungsstrecke auf, so ergibt sich eine Gerade (vgl. Abb. 4.2). Damit kann die relative Molekülmasse des zu untersuchenden Proteins bestimmt werden. Die Nachweisgrenze des Verfahrens liegt bei 0.1 µg Protein.

Tab. 3.2: Darstellung der verwendeten Lösungen

SDS Probenpuffer:

10 ml 20%ige SDS Lösung in Wasser
10 g Glycerin
2.5 ml Laemmli Sammelgelpuffer⁺
0.625 mol Tris/l und 0.5 % SDS, dessen pH-Wert mit
1 mol Salzsäure/l auf 6.8 eingestellt wird
Auf 100 ml mit H₂O auffüllen

Laemmli-Elektrophoresepuffer⁺:

2.42 g Tris
11.536 g Glycerin
0.8 g SDS
Auf 800 ml mit H₂O auffüllen

Bromphenolblau-Lösung:

5.0 ml Glycerin
0.5 g Bromphenolblau
Auf 100 ml mit H₂O auffüllen

Tab. 3.3: Herstellung von Laemmli-Trenn- und Sammelgel für Gele von 2 mm Schichtdicke und einer Fläche von 16 x 18 cm

Ansatz für 12.5%iges Laemmli-Trenngel:

- 30 ml der Lösung⁺: 25 g Acrylamid, 0.65 g Bisacrylamid, auf 100 ml mit H₂O auffüllen
- 18 ml H₂O
- 12 ml Laemmli-Trenngelpuffer⁺
2.5 g SDS, 113.5 g Tris und 150 ml Salzsäure 1 mol/l mit H₂O auf 500 ml auffüllen
- 400 µl 10%iges Ammoniumpersulfat in H₂O
- 40 µl Tetramethyläthylendiamin

Ansatz für 4%iges Laemmli-Sammelgel:

- 2 ml der Lösung⁺: 30 g Acrylamid, 1 g Bisacrylamid, auf 100 ml mit H₂O auffüllen
- 10 ml H₂O
- 3 ml Laemmli-Sammelgelpuffer⁺
0.625 mol Tris/l und 0.5 % an SDS mit 1 mol Salzsäure/l auf pH 6.8 einstellen
- 200 µl 10%iges Ammoniumpersulfat
- 20 µl Tetramethyläthylendiamin

Alle mit ⁺ gekennzeichneten Substanzen werden zur Reinigung durch ein Filter mit 0.45 µm Porendurchmesser gegeben.

Polyacrylamidgel Herstellung:

Das Polyacrylamidgel besteht aus einem 12,5%igen Laemmli-Trenngel (Tab. 3.3), welches von einem 4%igen Laemmli-Sammelgel (Tab. 3.3) überschichtet ist. Das Trenngel wird in den vorbereiteten Glasplattenapparat bis etwa 2 cm unterhalb des oberen Randes gegossen, so daß noch Platz für das Sammelgel bleibt. Bevor das Sammelgel über das Trenngel geschichtet wird, wird dieses mit 1%iger SDS Lösung übergossen und diese Lösung erst nach Bildung einer klaren Trennungslinie, die sich durch die Polymerisation des Gels bildet, wieder entfernt. In das Sammelgel wird ein Teflonrechen eingeschoben und erst nach Polymerisation entfernt. Dadurch entstehen Geltaschen, in die ca. 75 µl Probenflüssigkeit aufgetragen werden können.

3.3 Enzymatische Aktivität der SOD

3.3.1 Cytochrom-C-Reduktionstest

Die Aktivität der SOD wird mit dem Cytochrom-C-Reduktionstest /46,20/ bestimmt. Cytochrom-C wird mit O_2^- -Radikalen reduziert, welche im Untersuchungsmedium durch Zugabe einer bestimmten Menge Xanthin-Oxidase-Lösung von im Überschuß vorliegender Xanthinlösung freigesetzt werden. Die Menge des reduzierten Cytochrom-C ist an der mit der Reduktion korrelierten Farbänderung der Lösung erkennbar. Nach Zugabe von SOD konkurriert diese aufgrund ihrer enzymatischen Aktivität mit der Cytochrom-C-Lösung um die O_2^- -Radikale. Die Menge der reduzierten Cytochrom-C-Lösung nimmt daraufhin ab und läßt auf die Menge der SOD schließen.

Eine Einheit der SOD Aktivität wurde als die Menge definiert, welche eine 50%ige Hemmung der Cytochrom-C-Reduktionsrate unter definierten Bedingungen, wie unten erläutert, bewirkt /46/.

Es werden 3 ml Reaktionslösung hergestellt. Diese wird mit einem Kaliumphosphatpuffer (0.05 mol Kaliumphosphat/l, 100 μ mol EDTA/l, 10 μ mol Cytochrom-C/l, 50 μ mol Xanthin/l. Es wird Xanthin-Oxidase hinzugefügt, bis der anfängliche Extinktionsanstieg/min 0.025 beträgt.) auf pH 7.8 und 25 °C eingestellt. Da die Reaktion vom pH-Wert und der Temperatur abhängt, müssen diese genau eingehalten werden. Die Absorption wird mit einem Spektralphotometer (DU 7, Beckman, München) bei 550 nm Wellenlänge gemessen und die Extinktionswerte berechnet. Zur Hemmung der Cytochrom-C-Reduktionsrate um 50 % wird zur Reaktionslösung so lange eine bekannte Menge SOD gegeben, bis die anfängliche Extinktion/min nur noch 0.0125 beträgt. Die unter diesen Bedingungen zugegebene Menge SOD entspricht der enzymatischen Aktivität einer Einheit. Sie wird in Einheiten/mg angegeben.

3.3.2 Pyrogalloltest

Mit dem Pyrogalloltest wird die relative enzymatische Aktivität der SOD, bezogen auf einen Rinder-Cu-Zn-SOD Standard nach /43/, bestimmt. Die SOD überführt aufgrund ihrer enzymatischen Aktivität O_2^- -Radikale in H_2O_2 und verringert dadurch die Menge der O_2^- -Radikale, welche von Pyrogallol bei seiner Autoxidation im alkalischen Medium erzeugt werden. Die Änderung der Menge der O_2^- -Radikale ist mit der Farbänderung der Pyrogallollösung korreliert, welche im Experiment bestimmt wird.

Zu 9.9 ml luftgesättigtem Puffer (50 mmol Tris/l, 1 mmol Diäthylentriaminpentaessigsäure/l; mit 100%iger Essigsäure wird pH 8.2 eingestellt) werden 0.1 ml entgaster Puffer mit 0.2 mmol Pyrogallol/l gegeben. Die Reaktionslösung wird kräftig gemischt, und anschließend wird die Extinktionsänderung an einem Spektralphotometer (PM 2 DL, Carl Zeiss, Oberkochen) bei 420 nm Wellenlänge verfolgt. Die ermittelte Änderung der Extinktion/min entspricht 100%iger Oxidation. Anschließend wird der Test wiederholt, aber kurz vor der Messung werden jeweils 10 μ l SOD mit

einem Gehalt von 50 ng, 100 ng, und 200 ng Protein, welcher mit der Aminosäurenanalyse bestimmt wurde (Abschnitt 3.5), zur Reaktionslösung gegeben. Die resultierende Abnahme der Extinktionsänderung/min wird als Oxidationshemmung bezeichnet. Sie wird als Funktion der gelösten Menge SOD in ein Diagramm eingetragen (Abb. 4.3). Anhand der resultierenden Geraden wird die der Oxidationshemmung von 50 %/min entsprechende Menge SOD abgelesen, und die entsprechende Menge für die Standardsubstanz Rinder-Cu-Zn-SOD wird durch diesen Wert dividiert. Der Quotient ist die relative Aktivität der SOD.

3.4 Reduktion, S-Carboxymethylierung

Die Reduktion und S-Carboxymethylierung wird nach /10,67/ durchgeführt. Zu etwa 10 mg des Proteins werden jeweils 3 ml Puffer gegeben, welcher das Protein löst. Der Puffer besteht aus 1.5 mol Tris/l, 8 mol Harnstoff/l und 5 mmol EDTA/l. Der Puffer wird mit 1 mol Salzsäure/l auf pH 9 eingestellt. 20 µl Merkaptoäthanol werden zur Mischung gegeben, sie wird kurz mit N₂ begast und über Nacht bei Raumtemperatur dunkel gestellt. Nachdem 0.2 µmol (370 kBq) 2-¹⁴C Jodessigsäure zum Gemisch gegeben wurden und dieses kurz mit N₂ begast wurde, wird es bei Raumtemperatur für 15 min dunkel gestellt. Abermals werden 100 µl Merkaptoäthanol zum Gemisch gegeben, nach Begasung mit N₂ wird das Gemisch für 1 Std. bei Raumtemperatur dunkel gestellt. 260 mg Jodessigsäure werden in 600 µl von 1 mol Natronlauge/l gelöst und zum Gemisch gegeben. Nach kurzem Begasen mit N₂ und dunkel Stellen bei Raumtemperatur für 15 min wird das Gemisch sofort auf eine 2.5x25 cm Biogel P10 Säule (200-400 mesh) aufgetragen. Es wird in 70%iger Essigsäure ohne Lichteinwirkung chromatographiert. Das Protein wird identifiziert durch UV-Absorptionsmessungen der Elution bei einer Wellenlänge von 280 nm mit einer LKB Bromma Apparatur (Unicord S2138, Chopper Bar Recorder 2065, Multirack 2111), welche gleichzeitig die Extinktionswerte aufzeichnet und die Elution in 3 ml Fraktionen portioniert. Zusätzlich werden Radioaktivi-

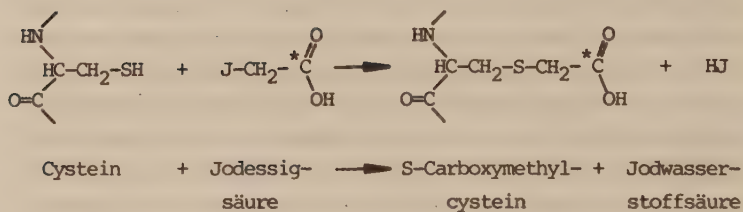
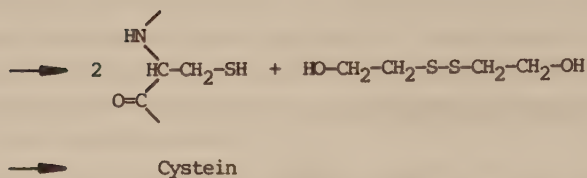
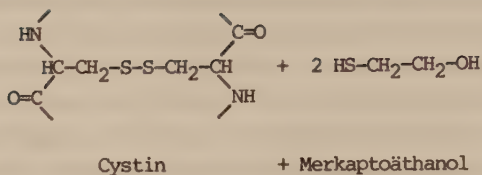


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der wesentlichen Reaktions-
schritte der Reduktion und S-Carboxymethylierung

* radioaktiv markiert

tätsmessungen jeder Fraktion durchgeführt, um die radioaktiv markierten proteinhaltigen Fraktionen zu ermitteln und das Ergebnis der Absorptionsmessung zu bestätigen. Zu 50 µl jeder Fraktion werden 10 ml Quickzint^R gegeben und die Zählraten mit einem Flüssigkeitsszintillationszähler Rackbeta 1217 (LKB Wallac) ermittelt. Die proteinhaltigen Fraktionen werden anschließend gepoolt und getrocknet, die anderen Fraktionen werden verworfen. Abbildung 3.1 gibt einen Überblick über die wesentlichen Reaktionsschritte der Reduktion und S-Carboxymethylierung.

3.5 Aminosäureanalysen

Die Aminosäurezusammensetzung eines hydrolysierten Proteins (vgl. Abschnitt 3.5.1) oder Peptids (1-5 nmol) wird mit einem LC 6001 Aminosäureanalysator (Biotronik, Frankfurt) nach /2/ untersucht und das Ergebnis mit einem C-RIA Integrator (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) ausgewertet.

Der Aminosäureanalysator besteht aus zwei Einheiten, einem Trennteil (Chromatographiesäule, Vorwaschsäule, Puffer, Regenerierlösung) und einem Nachweisteil (Reaktionsbad, Photometer).

Die Chromatographiesäule arbeitet nach der Einsäulen-Methode und trennt das Aminosäuregemisch in einzelne Aminosäuren auf. Sie ist 0.5x21 cm groß und ist mit DC 6A Kationenaustauschharz gefüllt. Da sich die Aminosäuren in saurer Lösung kationisch verhalten, werden sie beim Auftreffen auf das Harz dort an den funktionellen Gruppen, den Sulfonsäuregruppen, gebunden. Wie stark die Aminosäure vom Ionenaustauscher festgehalten wird, hängt von ihrem Ionisationszustand ab, d.h. von den Dissoziationskonstanten k der einzelnen Gruppen und vom pH-Wert des Elutionsmittels. Bei der Elution werden die Kationen mit Hilfe einer Reihe im pH-Wert steigender Puffer nach und nach vom Harz gelöst. Gemäß Tabelle 3.4 werden fünf im pH-Wert steigende Puffer

Tab. 3.4: Zeitliche Folge und pH-Werte der Puffer bei der As-Chromatographie

Puffer	pH-Wert	Zeit (min)	
A	3.16	5	
B	3.46	28	
C	4.35	22	
D	4.42	11	
E	10.11	32	
F	0.3 mol NaOH/l	12	
A	3.16	27	gesamte Zeit 137 min

verwendet. Sie stehen zur Elution nach einem bestimmten Trennprogramm bereit. Die Chromatographiesäule wird mit 0.3 mol Natronlauge/l regeneriert.

Die Aminosäuren verlassen zeitlich voneinander getrennt die Säule. Da der Trennvorgang temperaturabhängig ist, wird die Säule von einem temperierten Wassermantel umgeben. Die der Chromatographiesäule vorgeschaltete Vorwaschsäule hat die Aufgabe, das in den Pufferlösungen unvermeidlich enthaltene Ammoniak an das Vorwaschharz zu binden. Das Erscheinen des Ammoniaks im Eluat wird verzögert, so daß die Meßergebnisse nicht verfälscht werden.

Die Detektion der Aminosäuren wird mit Ninhydrin vorgenommen. Die Aminosäuren, welche die Chromatographiesäule verlassen, werden mit Ninhydrin versetzt und gelangen anschließend in ein Reaktionsbad, in dem bei siedendem Wasser die für die Aminosäure typische Blauviolettfröbung entsteht. Die primären Amine bilden bei der Reaktion mit Ninhydrin einen violetten Farbstoff, die sekundären Amine, wie Prolin und Hydroxyprolin, bilden einen gelblichen Farbstoff. Mit einem Photometer werden die entstandenen Farbkomplexe kontinuierlich und kolorimetrisch bei 570 nm bzw. 440 nm Wellenlänge in einer Durchflußküvette gemessen.

Die Extinktion wird definiert als der Logarithmus des Quotienten aus einfallender und durchgelassener Lichtintensität:

$$E = \log I_0/I = \epsilon \cdot c \cdot d$$

E = Extinktion der Probe

I_0 = einfallende Lichtintensität

I = durchgelassene Lichtintensität

ϵ = molarer Extinktionskoeffizient

c = Konzentration

d = Länge des Lichtweges innerhalb der Substanz in cm

Die Aufzeichnung der Photometermessung auf dem Schreiber erfolgt linear in der Extinktion. Die Retentionszeiten und die Fläche der jeweils aufgezeichneten Peaks geben Aufschluß über die Art und Menge der Aminosäuren in der Probe. Die Messung bei 570 nm wird zusätzlich mit einem Rechner-Integrator aufgezeichnet, der die Konzentrationen der in der Probe enthaltenen Aminosäuren errechnet. Die Konzentration der Aminosäure Prolin wird gesondert aus der Messung bei 440 nm errechnet.

3.5.1 Hydrolyse der Proteine und Peptide

In einem verschließbaren Hydrolyseröhrchen (10 x 1.3 cm) werden 1-5 nmol des Proteins oder Peptids vorgelegt und mit 1 ml H_2O und 1 ml einer 12 mol Salzsäure/l Lösung, welche 0.1 % Thioglykolsäure enthält, versetzt. Es wird entweder 2 Std. bei 150 °C oder 20 Std. bei 110 °C hydrolysiert. Die Proben werden anschließend im Wasserbad bei 50 °C unter Vakuum getrocknet. Nachdem 250 μ l Aminosäurenhydrolysat-Probenpuffer pH 2.2 (Tab. 3.5) zur Probe gegeben wurden, wird das Gemisch mit dem Aminosäurenanalysator (Abschnitt 3.5) untersucht. Die Hydrolyse bei der niedrigeren Temperatur ist schonender für die Probe als die Hydrolyse bei der höheren Temperatur, bei der zum Teil die Threonine und Serine der Probe zerstört werden. Das Tryptophan wird bei jeder Hydrolyse

Tab. 3.5: Darstellung des Aminosäurenhydrolysat-Probenpuffers:

7.2 g Natriumhydroxid
21.01 g Zitronensäure
0.5 g Borsäure
20 ml Thiodiäthanol
1 ml 0.1 %iges Pentachlorphenol in Äthanol absolut
auf 1 l mit H₂O auffüllen, pH 2.2 einstellen

zerstört. Es werden keine Werte für Glutamin und Asparagin erhalten, weil diese Aminosäuren in die jeweilige Dikarboxylsäure (Glutaminsäure, Asparaginsäure) umgewandelt werden. Die Peptidbindungen Valin-Valin, Valin-Isoleucin und Isoleucin-Isoleucin spalten nach Erfahrungswerten bei der 20 Std. dauernden Hydrolyse nur zu 50 % auf.

3.6 Trennung und Nachweis von Peptiden mit Hilfe der
Dünnschichtchromatographie

Die Peptide werden mit der Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und mit Ninhydrinspray /30/ nachgewiesen. Die Peptidsubstanzen werden jeweils in 50 µl eines Acetonitril/Wassergemisches (4:6 (V/V)) gelöst. Etwa 2 µl jedes Substanzgemisches, welche 2-3 nmol Protein enthalten, und etwa 5 nmol eines korrespondierenden Substanzgemisches tryptischer Peptide der Rinder-Cu-Zn-SOD und Menschen-Cu-Zn-SOD werden nebeneinander auf gleicher Höhe, 2 cm oberhalb der Plattenunterkante der TLC-Platten (Polygram 300, Macherey & Nagel, Düren) aufgetragen. Die Auftrennung der Substanzen erfolgt über eine Zeit von 2 Std. in einem Kammer-system, das mit einem Gemisch aus Butanol, Pyridin, Essigsäure und Wasser (75:50:15:60 (V/V)) gefüllt ist. Nachdem die TLC-Platte getrocknet ist, wird sie zur Entwicklung der den Substanzen entsprechenden Farbflecke mit 0.1%iger Ninhydrinlösung angesprüht und bei einer Temperatur von 95 °C abermals getrocknet. Den

Quotienten aus dem zurückgelegten Weg der Substanz und dem zurückgelegten Weg des Lösungsmittels bezeichnet man als Retentionsfaktor R_F . Die R_F -Werte der Substanzen werden miteinander verglichen. Die Nachweisgrenze für ein Peptid liegt für diese Methode etwa bei 1 nmol.

Herstellung der 0.1%igen Ninhydrinlösung:

50 mg Ninhydrin werden in 2 ml Trimethylpyridin gelöst. 15 ml Essigsäure werden hinzugefügt und mit Butanol auf 50 ml aufgefüllt.

3.7 C-terminale Sequenzanalyse

Bei der C-terminalen Sequenzanalyse werden die Aminosäuren sukzessiv vom C-terminalen Ende eines Peptids oder Proteins mit Carboxypeptidase A und B abgespalten und identifiziert /16,67/.

40-100 nmol des zu spaltenden Proteins oder Peptids werden in 500 μ l Methylmorpholin/Azetat Puffer (0.2 mol Methylmorpholin werden in 1 l 0.1%iger SDS Lösung gelöst, pH 8.0 wird mit 100%iger Essigsäure eingestellt) gelöst. 20 μ l (4 Einheiten) der frisch hergestellten Carboxypeptidase-A-Lösung werden hinzugegeben und die Reaktionslösung für 1 Std. bei 37 °C unter ständiger Bewegung inkubiert. Wenn bei dieser Behandlung nur wenige oder keine Aminosäuren abgespalten werden, werden 300 μ l (4.5 Einheiten) der gereinigten Carboxypeptidase-B-Lösung zur Reaktionslösung gegeben.

Falls der C-Terminus des zu spaltenden Peptids oder Proteins Arginin oder Lysin lautet, werden etwa 40-100 nmol des Peptids oder Proteins in 200 μ l Methylmorpholin/Azetat SDS Puffer gelöst und 300 μ l Carboxypeptidase-B-Lösung zur Proteinlösung gegeben. Nach zweistündiger Inkubation bei 37 °C der ständig bewegten Reaktionslösung werden 20 μ l (4 Einheiten) der frisch hergestellten Carboxypeptidase-A-Lösung zur Reaktionslösung gegeben und die Inkubation für 30 min fortgesetzt.

Während der Inkubation werden in verschiedenen Zeitabständen 50 µl der Reaktionslösung entnommen, 200 µl Aminosäurehydrolysat-Probenpuffer pH 2.2 (Tab. 3.5) zum Abstoppen der Spaltungsreaktion hinzugegeben und die Probe mit dem Aminosäureanalysator (Abschnitt 3.5) auf abgespaltene Aminosäuren untersucht. Die Identifizierung der Aminosäuren erfolgt durch Vergleich der Analysen mit den Standardaminosäureanalysen, die zur Untersuchung der Hydrolysen der Proteine und Peptide verwendet werden. Die benutzten Carboxypeptidasen und Puffer werden ebenfalls mit dem Aminosäureanalysator untersucht. Sollten bei der Spaltung Aminosäuren abgespalten werden, die nicht in den Standardanalysen enthalten sind (Asparagin, Glutamin), so werden von diesen separat Aminosäureanalysen zum Vergleich hergestellt.

Carboxypeptidase-A-Lösung

100 µl (100 Einheiten) Carboxypeptidase-A-Suspension werden zweimal in 5 ml H₂O von 0 °C aufgeschlämmt, leicht gerührt und 5 min bei 5000 U/min zentrifugiert. Der Überstand, der freie Aminosäuren enthält, wird verworfen. Der Rückstand der Carboxypeptidase A wird in 500 µl H₂O suspendiert. Durch Zugabe von 30 µl Natronlauge der Konzentration 0.1 mol/l wird die Carboxypeptidase A gelöst und aktiviert. Die Lösung hat einen pH Wert von 11.

Carboxypeptidase-B-Lösung

Die Carboxypeptidase B wird mit einer (0.8x4 cm) Sephadex G25 Säule (Partikelgröße 20-80 µm) in 0.1%iger Ammoniumhydrogenkarbonatlösung gereinigt. 50 µl Carboxypeptidase-B-Lösung (22.5 Einheiten) werden auf die Säule aufgetragen und 1.5 ml aufgefangen. Für die Spaltung werden 300 µl dieser gereinigten Carboxypeptidase-B-Lösung eingesetzt.

3.8 Spaltungen

3.8.1 Spaltung mit Bromcyan

Etwa 5-10 mg Protein werden in 3 ml 70%iger Ameisensäure gelöst. Die Lösung wird 5 min mit N₂ begast. Anschließend wird festes Bromcyan im molaren Überschuß von 1:100, bezogen auf den Methioningehalt der Polypeptidketten, zur Lösung gegeben. Nach einer Reaktionszeit von 4 Std. im Dunkeln bei Raumtemperatur wird das Reaktionsprodukt getrocknet, und die Bromcyan-Bruchstücke werden in 3 ml 70%iger Essigsäure gelöst /25/.

3.8.2 Spaltung mit Trypsin

Etwa 5-10 mg des Proteins werden etwa 15 Std. unter Vakuum getrocknet und anschließend in 1-2 ml 0.1%iger Ammoniumhydrogenkarbonatlösung gelöst und auf einen pH-Wert von 8.0 eingestellt. Um eine vollständige tryptische Spaltung zu erreichen, wird gereinigtes Trypsin im Enzym-/Substratgewichtsverhältnis 1:100 zur Proteinlösung gegeben. Nach Inkubation der Lösung bei 37 °C für 2 Std. unter ständiger Bewegung wird ein zweites Mal die gleiche Menge gereinigtes Trypsin zur Lösung gegeben. Die Lösung wird bei 37 °C unter ständiger Bewegung über Nacht inkubiert. Bei Beginn der Spaltungsreaktion wird der pH-Wert der Lösung ständig kontrolliert und falls nötig mit Ammoniumhydrogenkarbonat vorsichtig auf pH 8.0 hochtitriert. Die Spaltungsreaktion wird durch Einfrieren der Lösung auf -20 °C gestoppt.

Reinigung von Trypsin

Trypsin wird durch RP HPLC gereinigt /75/. 1 mg Trypsin, mit Tos Phe CH₂Cl behandelt, wird in 100 µl Lösungsmittel A (0.05 % Trifluoressigsäure in zweifach destilliertem Wasser) gelöst und direkt auf die Chromatographiesäule (Nukleosil 5C¹⁸ (0.72x25 cm),

Macherey & Nagel, Düren) aufgebracht. Zur Elution werden Lösungsmittel A und B (0.25 % Trifluoressigsäure in Acetonitril) benutzt, die einen Gradienten von 30-60 % Lösungsmittel B in A in 30 min bilden. Man erhält 3 ml (etwa 0.5 mg) gereinigtes Trypsin.

3.8.3 Spaltung mit Staphylokokkus aureus Proteinase V8

Vor der eigentlichen Spaltungsreaktion mit Staphylokokkus aureus Proteinase V8 /12,31,69/ werden etwa 10 mg des zu spaltenden Proteins in 2-3 ml 0.1%iger Ammoniumhydrogenkarbonatlösung gelöst und auf eine 2.5x15 cm lange Biogel P10 Säule (200-400 mesh) aufgetragen. Mit 0.1%iger Ammoniumhydrogenkarbonatlösung wird das Protein von den Resten der bei der Reduktion und S-Carboxymethylierung benutzten Essigsäure abgetrennt. Die Elution wird mit einem Fraktionssammler (vgl. Abschnitt 3.4) in 5 ml Fraktionen portioniert und gesammelt. Mit Hilfe von Absorptions- und Radioaktivitätsmessungen der Elution werden diejenigen Fraktionen ermittelt und gepoolt, die den höchsten Proteingehalt besitzen. Die Lösung des zu spaltenden Proteins, die auf diese Weise erhalten wurde, wird auf pH 7.8 eingestellt. 100 µg Staphylokokkus aureus Proteinase V8 werden zur Lösung gegeben. Die Reaktionslösung wird 2 Std. bei 37 °C unter ständiger Bewegung inkubiert. Der pH-Wert wird in Abständen von 30 min überprüft und falls nötig auf den Wert 7.8 zurücktitriert. Nach der Inkubationszeit werden zum zweiten Mal 100 µg Staphylokokkus aureus Proteinase V8 zur Lösung gegeben. Sie wird über Nacht erneut unter ständiger Bewegung bei 37 °C inkubiert. Die Spaltungsreaktion wird durch Einfrieren auf -20 °C gestoppt.

3.8.4 Spaltung mit Hydroxylamin

Die Spaltung mit Hydroxylamin wird nach /4,6,73/ durchgeführt. 1-2 mg Protein werden in 1 ml Guanidinhydrochloridlösung (8 mol Guanidinhydrochlorid/l, pH 6.6 wird mit einer Lösung von 0.4 mol Natriumhydroxid/l eingestellt) gelöst. Zu dieser Proteinlösung wird 1 ml frisch zubereitete Hydroxylaminlösung (4 mol Hydroxylamin/l gelöst in wäßriger Lösung von 0.4 mol Kaliumkarbonat/l) gegeben und die Reaktionslösung im verschlossenen Gefäß 3 Std. bei 45 °C inkubiert.

Vorbereitung der Hydroxylaminlösung

10 ml Natronlauge der Konzentration 12.5 mol/l und 10 ml Kaliumkarbonatlösung der Konzentration 1 mol/l werden zubereitet und im Eisbad temperiert. Zu 0.05 mol Hydroxylamin-Hydrochlorid, welches ebenfalls im Eisbad temperiert wird, werden unter heftigem Rühren 2.5 ml Eiswasser und anschließend 2 ml der Natronlauge und 5 ml der Kaliumkarbonatlösung gegeben. Die erhaltene Lösung wird mit Natronlauge der Konzentration 12.5 mol/l auf pH 9 eingestellt.

3.9 Trennung der Spaltpeptide

3.9.1 Trennung der Peptide aus der Spaltung mit Bromcyan

Die in 3 ml 70%iger Essigsäure gelösten Bromcyan-Spaltpeptide werden auf eine 2.8x50 cm Biogel P10 Säule (200-400 mesh) aufgetragen und in 70%iger Essigsäure chromatographiert. Die Identifizierung und Fraktionierung der ~~Bromcyan-Peptide~~ erfolgt mit der in Abschnitt 3.4 beschriebenen Apparatur. Die jeweiligen Fraktionen der entsprechend separierten Peptide werden gepoolt und getrocknet, die anderen Fraktionen werden verworfen. Von jeder gepoolten Substanz wird eine Aminosäurenanalyse angefertigt.

3.9.2 Trennungen der Peptide aus den Spaltungen mit Trypsin, Staphylokokkus aureus Proteinase V8 oder Hydroxylamin

Die Separierung der tryptischen Peptide und der Peptide, die durch Spaltung mit Staphylokokkus aureus Proteinase V8 oder Hydroxylamin entstehen, wird mit RP HPLC durchgeführt /36,67/. Für die Analysen wird ein Analysator (Beckman, München) verwendet, der aus zwei Lösungsmittellieferanten (Modell 100A und 110A), einem Detektor mit variabel einstellbarer Wellenlänge (Modell 165) und einem Gradientenerzeuger (Modell 420) besteht. Als Lösung A wird 0.05%ige wäßrige Trifluoressigsäure und als Lösung B 0.025%ige Trifluoressigsäure in Acetonitril verwendet. Ein linearer Gradient von 0-60 % von Lösung B in Lösung A wird über eine Zeit von 60 min aufgebaut. Die Durchflußrate der Säule ist konstant und beträgt 1.4 ml/min bei einer Temperatur von 50 °C.

Jeweils 100 µl der aufzutrennenden Peptidlösung, die ca. 10 nmol Substanz enthalten, werden auf die 0.72x25 cm Nukleosil 5C¹⁸ Säule (Macherey & Nagel, Düren) aufgetragen. Die verschiedenen Peptide verlassen zeitlich voneinander getrennt die Säule und werden mit Hilfe von UV-Absorptionsmessungen bei einer Wellenlänge von 214 nm identifiziert und als Peak im Elutionschromatogramm registriert. Die den Peaks zugeordneten Peptidsubstanzen werden separat gesammelt. Von der Substanz jedes Peaks eines chromatographischen Durchlaufes wird eine Aminosäurenanalyse, wie in Abschnitt 3.5 beschrieben, durchgeführt.

3.10 Sequenzanalyse

3.10.1 Automatischer Edman-Abbau mit einem Festphasensequenzator

Zur Durchführung der Sequenzanalyse bei Peptiden und Proteinen wird ein LKB 4020 Festphasensequenzator, der nach dem Prinzip des Edman-Abbaus weitgehend automatisch arbeitet, verwendet /13/. Zur Sequenzanalyse mit dem Gerät sind etwa 15-60 nmol des zu sequen-

zierenden Peptids oder Proteins erforderlich. Ausschlaggebend dafür, wie viele aufeinanderfolgende Abbauschritte an einem Protein möglich sind, ist die maximal erreichbare Ausbeute jedes Schrittes. Geht man davon aus, daß nach einer bestimmten Zahl von Abbauzyklen die erreichbare Ausbeute auf 30 % gefallen ist, so sind weitere Abbauschritte wegen der zunehmenden Unsicherheit der Ergebnisse nicht sinnvoll. Damit ergibt sich, daß bei einer durchschnittlichen Ausbeute von 97 %, 98 % oder 99 % pro Abbauschritt insgesamt 40, 60 oder 120 Abbauzyklen möglich sind /15/. Der verwendete LKB 4020 Festphasensequenator erreicht eine durchschnittliche Ausbeute von bis zu 98 % pro Abbauschritt, so daß etwa 60 Abbauzyklen möglich sind.

Für den Edman-Abbau mit dem Festphasensequenator wird das zu sequenzierende Peptid oder Protein mit seinem C-Terminus kovalent an einen inaktiven Träger, Aminopropylglas, gebunden und in die Reaktionssäule gefüllt, welche von einem Wassermantel von 50 °C umgeben ist. Die für den Edman-Abbau benötigten Reagenzien, welche die Aminosäuren vom N-Terminus des Peptids oder Proteins

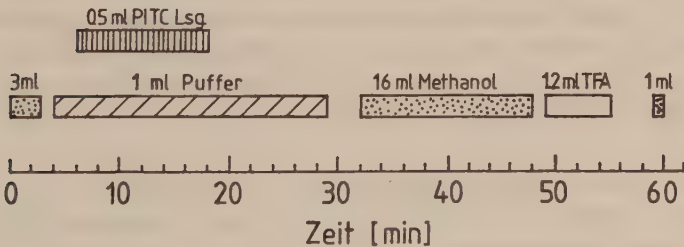


Abb. 3.2:

Zeitlicher Ablauf eines Edman-Abbau-Zyklus mit dem Festphasensequenator. Die Balken zeigen auf der Zeitskala an, wann die Reagenzien durch die Reaktionssäule gepumpt werden, die jeweiligen Flüssigkeitsmengen sind angegeben.

- Methanol, Festphasen-Sequenzierpuffer I,
 PITC-Lsg., TFA

sukzessiv freisetzen, werden durch die Reaktionssäule gepumpt. Mit Hilfe eines Programms, das über eine Lochkarte eingelesen wird, werden die Reaktionsschritte koordiniert. Der Programmablauf ist in Abb. 3.2 dargestellt.

Beim Edman-Abbau handelt es sich um eine Zwei-Schritte-Reaktion, den Kupplungsschritt und den Abspaltungsschritt, das Prinzip ist in Abbildung 3.3 erläutert.

Während des Kupplungsschrittes reagiert die α -Aminogruppe des N-terminalen Restes mit Phenylisothiocyanat (PITC) (5%ige Lösung PITC in Acetonitril) und bildet das Phenylthiocarbamyl-Peptid (PTC). Da die α -Aminogruppe nur im nicht positiv geladenen Zustand mit dem PITC reagiert, wird gleichzeitig mit dem PITC ein Festphasen-Sequenzierpuffer I pH 8.1 durch die Reaktionssäule gepumpt. Zum Abtransport der überschüssigen Reagenzien aus der Reaktionssäule dient Methanol.

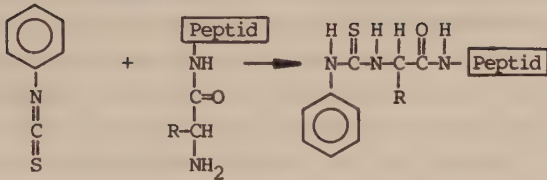
Der Abspaltungsschritt erfolgt bei der Behandlung des PTC-Peptids mit wasserfreier Trifluoressigsäure (TFA). Die TFA bewirkt die Zyklisierung des PTC-Peptids und setzt gleichzeitig die N-terminale Aminosäure als eine Anilinothiazolinon-Aminosäure (ATZ) frei. Die ATZ-Aminosäure wird mit 1 ml TFA in den Fraktionssammler abgeleitet und von einem Gefäß, in dem sich bereits 2 ml H_2O befinden, aufgefangen.

Zum Schluß des Abbauzyklus wird die Reaktionssäule mit 1 ml Methanol gespült, welches ebenfalls in das Gefäß abgeleitet wird. Die Reaktionssäule steht nun für den folgenden Abbauzyklus bereit.

Konvertierung

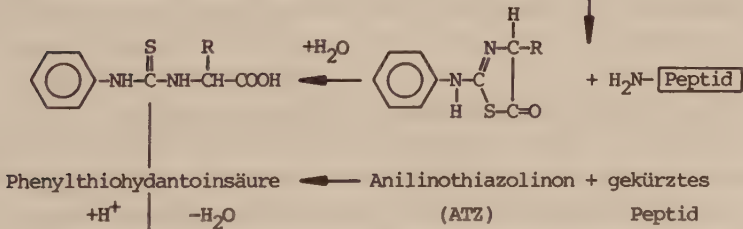
Die Konvertierung der instabilen, zur Identifizierung ungeeigneten ATZ-Derivate der Aminosäuren in die stabileren Phenylthiohydantoin-Derivate (PTH) findet in einem Flüssigkeitsgemisch von

1. Kupplungsschritt

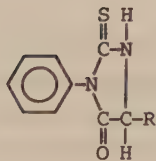


Phenylisothio- + Peptid $\rightarrow$ Phenylthiocarbamyl-Peptid
cyanat (PITC) (PTC)

2. Abspaltungsschritt



3. Konvertierung



Phenylthiohydantoin
(PTH)

Abb. 3.3: Das Prinzip des Edman-Abbaus

25 % TFA, 25 % Methanol und 50 % H₂O bei einer Temperatur von 57 °C über eine Zeitdauer von etwa 1 Std. statt. Das ATZ-Derivat der Aminosäure wird in dem wäßrigen Milieu mit Hilfe von TFA zu Phenylthiohydantoinensäure hydrolysiert, die unter Ringschluß in das PTH-Derivat der Aminosäure übergeht. Die Umlagerung des ATZ-Derivates kann sich in wasserfreiem Milieu auch intramolekular vollziehen. Während der Konvertierung wird das im Wasserbad stehende Flüssigkeitsgemisch ständig mit N₂ begast, so daß nach 1 Std. die PTH-Derivate der Aminosäuren in getrocknetem Zustand vorliegen. Die PTH-Derivate der Aminosäuren werden in 10-20 µl Essigsäureäthylester aufgenommen. Dieses sehr schonende Konvertierungsverfahren gewährleistet, daß das bei der Konvertierung recht anfällige ATZ-Derivat des Serins und Threonins zum größten Teil erhalten bleibt und auch die PTH-Derivate des Asparagins und Glutamins nur zu einem sehr geringen Teil zu den entsprechenden PTH-Derivaten der Asparaginsäure bzw. Glutaminsäure hydrolysieren.

3.10.2 C-terminale Peptidanbindung an Aminopropylglas

Bevor die Peptide mit dem Festphasensequenator (LKB 4020) sequenziert werden können, werden sie jeweils an den inaktiven Träger, das Aminopropylglas, mit ihrer terminalen Carboxylgruppe angebunden /61/.

Das getrocknete Peptid (15-60 nmol Substanz) wird in etwa 200 µl wasserfreier TFA aufgenommen und bei Raumtemperatur gelöst. Nach 15 min Stehen bei Raumtemperatur wird es im Vakuum über KOH-Pellets für 25-30 min getrocknet. Zu dem getrockneten Peptid werden 2 mg 1-Äthyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) gegeben, welches in 200 µl anilinfreiem Dimethylformamid gelöst wird. Die Mischung wird für 1 min geschüttelt. 50 mg Aminopropylglas werden hinzugefügt. Die Mischung wird 30 min bei 40 °C geschüttelt, anschließend zweimal mit 1 ml Methanol gewaschen und mit einer Tischzentrifuge (Zentrifuge 00702, Heraeus Christ GmbH,

Osterode) 3 min bei 2000 U/min zentrifugiert. Der Überstand, der unangebundene Peptide enthält, wird verworfen. Der Niederschlag, das an Aminopropylglas angebundene Peptid, wird bei 57 °C im Wasserbad getrocknet und in die Mitte der Reaktionssäule des Sequenators gefüllt. Die Enden der Reaktionssäule werden mit gewaschenem Glas gefüllt. Anschließend wird die Reaktionssäule in den Sequenator eingebaut.

3.10.3 Nachweis und Identifizierung der PTH-Aminosäuren

Die PTH-Aminosäuren werden mittels Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten (HPLC-Platten, Kieselgel 60 FC 254, Merck), welche mit einem Fluoreszenzindikator versehen sind, nachgewiesen /67/. Etwa 5-10 nmol der in Essigsäureäthylester vorliegenden PTH-Aminosäuren werden jeweils abwechselnd neben die Referenzsubstanzen auf Kieselgelplatten aufgetragen. Die Entwicklung des Chromatogramms erfolgt nacheinander in drei Systemen durch eindimensionale Auftrennung.

Im ersten System erfolgt die Auftrennung mit Propionsäure-tertiärem-Butylester. 75 ml werden in die Kammer gefüllt /37/.

14 ml 100%ige Essigsäure und 60 ml Dichloräthan werden in das zweite Kammerssystem zur weiteren Auftrennung gegeben /14/.

Die Auftrennung im dritten Kammerssystem erfolgt mit 50 ml Dichloräthan und 25 ml Äthanol /66/.

Nach jeder Auftrennungsstufe erfolgt die Identifizierung der PTH-Aminosäuren durch Betrachtung der getrockneten Kieselgelplatten unter ultraviolettem Licht. Die PTH-Aminosäuren erscheinen als schwarze Flecken vor gelbgrünem Hintergrund. Durch Vergleich der R_F -Werte der PTH-Aminosäuren und der R_F -Werte der Referenzsubstanzen nach jedem Kammerssystem erfolgt die Identifizierung der

Tab 3.6: PTH-Aminosäuren der drei Referenzsubstanzgemische

Referenzsubstanz- gemisch I	Referenzsubstanz- gemisch II	Referenzsubstanz- gemisch III
Asparagin	Arginin	Asparaginsäure
Serin	Histidin	Glutaminsäure
Glycin	Glutamin	Phenylalanin
Alanin	Threonin	Tryptophan
Prolin	Lysin	Isoleucin
Valin	Tyrosin	
	Methionin	
	Leucin	

PTH-Aminosäuren. Zur Dokumentation wird die Kieselgelplatte unter UV-Licht fotografiert. Die Nachweisgrenze dieser Methode für PTH-Aminosäuren liegt bei 1-2 nmol Substanz.

Zur besseren Zuordnung der PTH-Aminosäuren werden drei verschiedene Referenzsubstanzgemische (Tab. 3.6) verwendet. Jeweils 2 mg der kombinierten PTH-Aminosäuren werden in 1 ml Methanol und 1 ml Essigsäureäthylester gelöst. Jeweils 1 µl dieser Referenzsubstanzgemische wird auf die Kieselgelplatte aufgetragen.

Die radioaktiv markierten S-Carboxymethylcysteine werden mit Hilfe von Radioaktivitätsmessungen identifiziert. Die Zählraten für die PTH-Aminosäuren werden aus den drei Abbauschritten vor und nach, sowie bei dem vermuteten PTH-S-Carboxymethylcystein bestimmt. Für die dünnschichtchromatographische Identifizierung der PTH-Aminosäuren werden in der Regel 50 % der Substanz oder weniger verbraucht. Der in den Sequenatorröhrchen verbleibende Rest wird mit 100 µl Essigsäureäthylester versetzt und gut geschüttelt. Er wird in 10 ml Quickzint^R gegeben, und anschließend werden die Zählraten mit einem Flüssigszintillationszähler (1217 Rackbeta, LKB Wallac) ermittelt.

4. ERGEBNISSE

4.1 Schweine-Cu-Zn-SOD

Für die proteinchemische Enzymcharakterisierung der Cu-Zn-SOD des Schweines (*Sus scrofa domesticus*) standen 20 mg gereinigte Cu-Zn-SOD vom Blut mehrerer Schweine und 5 mg gereinigte Cu-Zn-SOD vom Blut eines Schweines zur Verfügung.

4.1.1 Charakterisierung des Ausgangsmaterials

Reinheit und relative Molekülmasse

Die Untersuchungen der Reinheit und der relativen Molekülmasse der Untereinheiten von Schweine-Cu-Zn-SOD erfolgten mit der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (Abschnitt 3.2). Vor der Auftragung der Proben auf das Gel wurden die Disulfidbindungen reduktiv gespalten. Für die Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurden 10, 15, 20 und 25 µg der Schweine-Cu-Zn-SOD als Proben aufgetragen. In Abbildung 4.1 ist eine Fotografie des Gels abgebildet. Links und rechts wurden die Referenzsubstanzen (vgl. Abschnitt 3.2) und in der Mitte die Schweine-Cu-Zn-SOD aufgetragen. Es erschien eine klare Bande bei allen aufgetragenen Proben. In Abbildung 4.2 ist die relative Molekülmasse der Referenzsubstanzen als Funktion des Weges aufgetragen. Mit Hilfe dieses Diagramms konnte die relative Molekülmasse der SOD aus der Lage der Banden in Abb. 4.1 zu etwa 16000 Da bestimmt werden. Dieser Wert stimmt gut mit dem theoretisch ermittelten Wert von 15800 Da überein. Da jede Probe der Schweine-Cu-Zn-SOD als einheitliche Bande im Gel erschien, kann man darauf schließen, daß identische Untereinheiten bei der Schweine-Cu-Zn-SOD vorliegen. Nach ihrem Verhalten bei der Gel-filtration ist die native Schweine-Cu-Zn-SOD ein Dimer von identischen Untereinheiten. Eine Proteinkontamination der aufgetragenen Proben war nicht erkennbar, die Reinheit der Schweine-Cu-Zn-SOD beträgt somit mindestens 95 %.

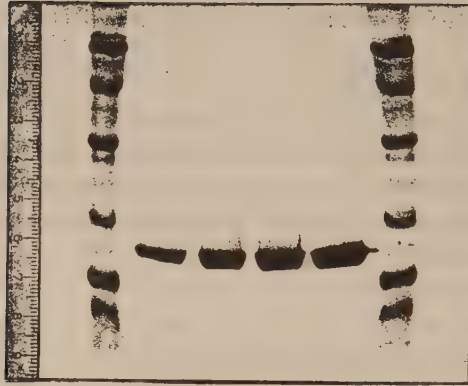


Abb. 4.1: Fotografie des SDS Polyacrylamidgels. In der Mitte wurden die SOD-Proben und rechts und links die Referenzsubstanzen aufgetragen.

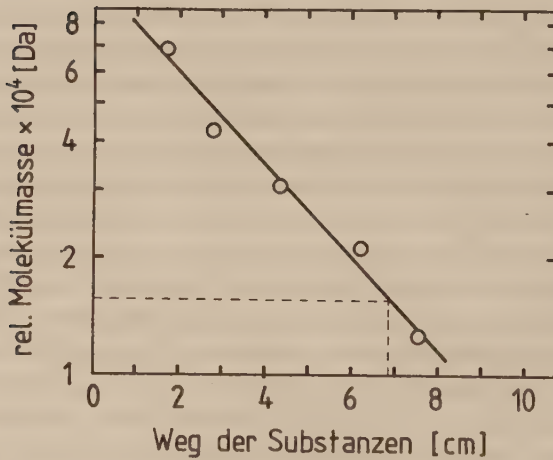


Abb. 4.2: Auswertung des SDS Polyacrylamidgels (Abb. 4.1). Die relative Molekülmasse ist als Funktion des Weges der Referenzsubstanzen aufgetragen. Mit Hilfe dieses Diagramms wurde die relative Molekülmasse für Schweine-Cu-Zn-SOD bestimmt.

Enzymatische Aktivität

Die enzymatische Aktivität der gereinigten Schweine-Cu-Zn-SOD wurde mit dem Cytochrom-C-Reduktionstest (Abschnitt 3.3.1) und dem Pyrogalloltest (Abschnitt 3.3.2) bestimmt.

Die Aktivität der gereinigten Schweine-Cu-Zn-SOD wurde mit dem Cytochrom-C-Reduktionstest zu 3000 ± 200 Einheiten/mg Protein bestimmt. Mit dem Pyrogalloltest wurde die relative enzymatische Aktivität, bezogen auf einen Rinder-Cu-Zn-SOD Standard, zu 82 % bestimmt, die Meßergebnisse sind in Abbildung 4.3 wiedergegeben.

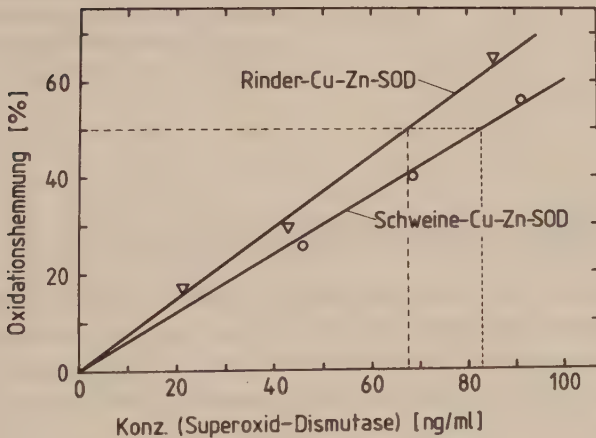


Abb. 4.3: Oxidationshemmung im Pyrogalloltest als Funktion der SOD-Konzentration. Die Kreise (○) geben die Resultate für Schweine-Cu-Zn-SOD wieder, die Dreiecke (▽) wurden zum Vergleich an Rinder-Cu-Zn-SOD-Standardsubstanz gemessen.

UV-Absorptionsspektrum

Das UV-Absorptionsspektrum von Schweine-Cu-Zn-SOD ist in Abbildung 4.4 dargestellt. Es läßt auf einen geringen Tyrosin- und Tryptophangehalt schließen. Die Aminosäurenanalyse weist zwei Tyrosine aus (vgl. Tab. 4.1). Das Verhältnis der Absorptionen bei 280 nm und 260 nm beträgt 0.9 /28/.

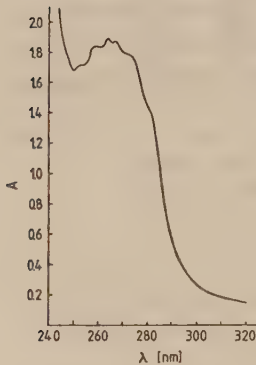


Abb. 4.4:

UV-Absorptionsspektrum von Schweine-Cu-Zn-SOD.

Die Enzymkonzentration betrug 4 mg/ml Protein in einem Phosphatpuffer der Konzentration 0.01 mol/l bei pH 7.0 /28/.

Aminosäurezusammensetzung der Schweine-Cu-Zn-SOD

Zur Aufklärung der Primärstruktur der Schweine-Cu-Zn-SOD wurden die beiden Untereinheiten der SOD, welche durch intramolekulare Bindungen miteinander verbunden sind, unter den Bedingungen der Reduktion und S-Carboxymethylierung (Abschnitt 3.4) isoliert und entfaltet.

Die Wasserstoffbrückenbindungen und die ionischen und hydrophoben Wechselwirkungen werden durch die Behandlung mit Harnstoff der Konzentration 8 mol/l aufgehoben. Disulfidbrücken werden reduktiv mit Merkaptoäthanol gespalten (Abb. 3.1). Die bei der Spaltung gebildeten Sulfhydryl-Gruppen werden leicht reoxydiert und werden

deshalb durch Zugabe von Jodessigsäure blockiert, welche die SH-Gruppen der Cysteine carboxymethyliert. Das so entstehende S-Carboxymethylcystein ist relativ stabil und bleibt auch beim Sequenzieren bestehen. Zum gezielten Auffinden der Cu-Zn-SOD im Laufe der verschiedenen Prozessschritte werden die Cysteine der Cu-Zn-SOD mit ^{14}C gekennzeichnete Jodessigsäure radioaktiv markiert. Um die bei der Reduktion und S-Carboxymethylierung verwendeten Substanzen von der Cu-Zn-SOD zu trennen, wird eine Gelfiltration über eine Säule durchgeführt.

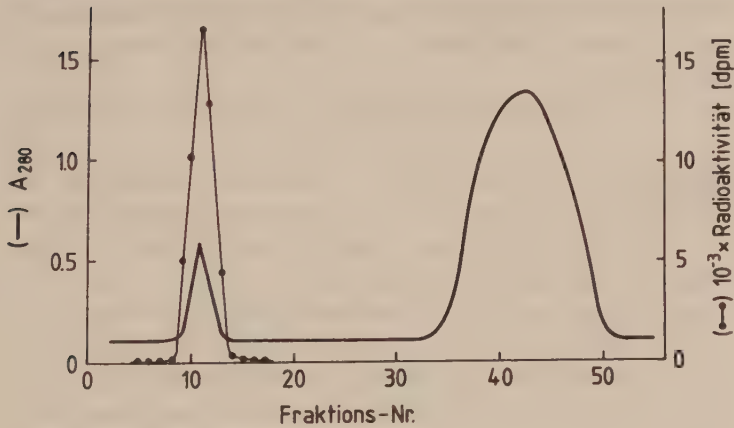


Abb. 4.5: Gelfiltration der carboxymethylierten Schweine-Cu-Zn-SOD über eine Biogel P10 Säule (2.5x25 cm). Die SOD (linker Peak) wurde mit Absorptionsmessungen bei 280nm Wellenlänge (—) und Radioaktivitätsmessungen der ^{14}C markierten Cysteine mit einem Flüssigkeitsszintillationszähler (●—●) identifiziert. Sie erscheint getrennt von den bei der Reduktion und S-Carboxymethylierung verwendeten Substanzen (rechter Peak).

Für die Reduktion und S-Carboxymethylierung wurden 1000 nmol Cu-Zn-SOD vom Blut mehrerer Schweine und 500 nmol Cu-Zn-SOD vom Blut eines Schweines eingesetzt. In Abb. 4.5 ist das Diagramm der Trennung der radioaktiv markierten Schweine-Cu-Zn-SOD aus dem Blut mehrerer Schweine von den bei der Reduktion und S-Carboxymethylierung verwendeten Substanzen dargestellt. In Tab. 4.1 sind die Werte der Aminosäurenanalyse und die Aminosäurenkomposition der Schweine-Cu-Zn-SOD vom Blut mehrerer Schweine angegeben.

Die Aminosäurenanalyse zeigt, daß die Primärstruktur der Schweine-Cu-Zn-SOD aus 152 Aminosäuren aufgebaut ist. Kennzeichnend für ihre Sequenz sind zwei Tyrosine, ein Cystein und ein Cystin /28/, welche bei der Aminosäurenanalyse als drei S-Carboxymethylcysteine identifiziert wurden, ein Methionin, vier Arginine und elf Lysine.

Aminosäure	Schweine-SOD
Asx	14.9 (15)
Thr	11.7 (13)
Ser	7.0 (7)
Glx	14.3 (14)
Pro	6.5 (5)
Gly	26.4 (26)
Ala	10.2 (9)
Cys ^o	3.2 (3)
Val	14.4 (14)
Met	1.1 (1)
Ile	6.5 (8)
Leu	8.2 (8)
Tyr	2.1 (2)
Phe	4.3 (4)
His	6.8 (8)
Lys	10.6 (11)
Arg	4.3 (4)
Gesamtzahl	152

Tab. 4.1:

Ergebnisse der Aminosäurenanalyse der Schweine-Cu-Zn-SOD. Die in Klammern angegebenen Werte für die Aminosäurenkomposition wurden aus der Sequenzanalyse erhalten. Die Zahlenwerte sind pro Molekül angegeben.

(a) als S-Carboxymethylcystein ermittelt.

4.1.2 N-Terminus der Schweine-Cu-Zn-SOD

Mit der N-terminalen Sequenzanalyse (Abschnitt 3.10) konnte bei der carboxymethylierten Schweine-Cu-Zn-SOD und bei Peptid CB₁ und T₁ die Endgruppe nicht ermittelt werden, da der Abbau der Aminosäuren blockiert war. Um den N-Terminus der Schweine-Cu-Zn-SOD dennoch zu ermitteln, wurde die C-terminale Sequenzanalyse (Abschnitt 3.7) angewendet. Um möglichst wenige Aminosäuren vom C-terminalen Ende abzuspalten, bis die N-terminale Endgruppe erreicht wird, wird das tryptische Peptid T₁ (Abschnitt 4.1.6) für die C-terminale Sequenzanalyse verwendet. Die Aminosäurenanalyse (Tab. 4.3) zeigt, daß dieses Peptid aus den drei Aminosäuren Alanin, Threonin, Lysin aufgebaut ist.

Identität und Acetylierung des tryptischen Peptids T₁:

Das Verhalten des blockierten N-terminalen tryptischen Peptids bei den folgenden Untersuchungen diene als Beweis für die Identität des Peptids T₁ und die Acetylierung des N-Terminus.

- Bei der Trennung der tryptischen Spaltpeptide über RP HPLC (Abschnitt 3.9.2) zeigt das Peptid gleiche Retentionszeiten wie das Peptid T₁ von Menschen- und Rinder-Cu-Zn-SOD.
- Die Aminosäurenanalyse des Peptids (Tab. 4.3) war identisch zu den korrespondierenden tryptischen Peptiden T₁ der Menschen- und Rinder-Cu-Zn-SOD (Abb. 5.1).
- Bei der Untersuchung des Peptids mit der Dünnschichtchromatographie (Abschnitt 3.6) zeigt das Peptid gleiche R_F-Werte wie die korrespondierenden acetylierten Peptide T₁ der Menschen- und Rinder-Cu-Zn-SOD.

C-terminale Sequenzanalyse von Peptid T₁:

Die Aminosäuresequenz von Peptid T₁ wurde mit der C-terminalen Sequenzanalyse (Abschnitt 3.7) ermittelt. 40 nmol Substanz des Peptids T₁ wurden für die Spaltung eingesetzt. Da es sich bei dem tryptischen Peptid T₁ um ein Peptid handelt, welches am C-terminalen Ende die Aminosäure Lysin besitzt (Abschnitt 4.1.6, Tab. 4.3), wurde zur Abspaltung dieser Aminosäure zuerst Carboxypeptidase B eingesetzt, welche die basischen Aminosäuren Lysin und Arginin spezifisch vom C-terminalen Ende des Peptids abspaltet. Nach 1 Std. der Inkubationszeit wurde die Aminosäure Lysin in der Reaktionslösung nachgewiesen. Die Reaktionslösung wurde eine weitere Stunde inkubiert, dann wurde zur Abspaltung der folgenden Aminosäuren Carboxypeptidase A zur Reaktionslösung gegeben. Carboxypeptidase A spaltet alle Aminosäuren außer Arginin, Histidin, Lysin und Prolin sukzessiv C-terminal ab. Die Aminosäuren mit großen hydrophoben Seitenketten, wie Leucin und die aromatischen Aminosäuren, werden bevorzugt abgespalten. Erfahrungswerte zeigen, daß Glycin nur sehr schlecht abgespalten wird. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurde zusätzlich zur Aminosäure Lysin die Aminosäure Threonin in der Reaktionslösung nachgewiesen.

Die Acetylierung des Peptids T₁ gilt als bewiesen. Seine Aminosäurenanalyse zeigt drei Aminosäuren, Alanin, Threonin und Lysin (Tab. 4.3). Da bei der C-terminalen Sequenzanalyse erst Lysin und dann Threonin abgespalten wurde, lautet die komplette Sequenz des Peptids T₁:

Acetyl-Ala-Thr-Lys

4.1.3 C-Terminus der Schweine-Cu-Zn-SOD

Der C-Terminus der Schweine-Cu-Zn-SOD wurde mit C-terminaler Sequenzanalyse (Abschnitt 3.7) bestimmt. Die sukzessive Abspaltung der C-terminalen Aminosäuren wurde mit Carboxypeptidase A

(Abschnitt 4.1.2) durchgeführt. Für die Spaltung wurden 100 nmol carboxymethylierte Schweine-Cu-Zn-SOD eingesetzt. Die Analysen der der Reaktionslösung nach 1, 5, 10, 20, 30, 60 min der Inkubationszeit entnommenen Proben zeigten die Abspaltung der Aminosäuren in der Reihenfolge Glutamin, Threonin, Isoleucin.

Der C-Terminus der Schweine-Cu-Zn-SOD lautet: -Ile-Thr-Gln-OH

4.1.4 Spaltungen und Sequenzierungsstrategie

Jede der beiden Untereinheiten der Schweine-Cu-Zn-SOD ist 152 Aminosäuren lang (vgl. Abschnitt 4.1.1), so daß die komplette Sequenz nicht unmittelbar mit der N-terminalen Sequenzanalyse (Abschnitt 3.10) ermittelt werden kann. Zunächst muß das Protein in kleinere Fragmente zerlegt werden. Der N-Terminus der Schweine-Cu-Zn-SOD ist acetyliert, so daß das entsprechende Fragment gesondert analysiert werden muß (vgl. Abschnitt 4.1.2).

Die Fragmentierung des Proteins kann durch spezifische enzymatische oder chemische Spaltungen erfolgen. Die entstehenden Peptide jeder Spaltung werden jeweils getrennt und jedes für sich auf seine Aminosäuresequenz untersucht. Da bei der Anwendung nur einer Spaltungsmethode zwar die Sequenz der einzelnen Aminosäuren in den Spaltpeptiden bestimmt wird, nicht aber die Reihenfolge der Peptide, müssen zur vollständigen Aufklärung der Primärstruktur eines Proteins zumindest zwei voneinander unabhängige Spaltungen durchgeführt werden. Die Reihenfolge der Peptide kann dann nach dem Prinzip der überlappenden Spaltung ermittelt werden, und die Spaltpeptide können zur Primärstruktur des Proteins zusammengesetzt werden.

Im vorliegenden Fall ließen der geringe Methioningehalt der Schweine-Cu-Zn-SOD von 0.7 % eine methioninspezifische Spaltung mit Bromcyan und der hohe Gehalt an Lysin und Arginin von 9.8 %

eine Spaltung mit Trypsin sinnvoll erscheinen. Zusätzlich wurde eine Spaltung mit Staphylokokkus aureus Proteinase V8 durchgeführt, um Peptide zu erhalten, welche die tryptischen überlappen.

4.1.5 Bromcyan-Peptide

Bei der Bromcyan-Spaltung handelt es sich um eine chemische Spaltung. Die Polypeptidkette wird spezifisch hinter Methionin gespalten, weitgehend unabhängig von der darauffolgenden Aminosäure. Das Methionin wird bei der Spaltung in Homoserin-Lakton umgewandelt /25,79/. Abb. 4.6 zeigt die Reaktion eines mit Bromcyan gespaltenen Peptids.

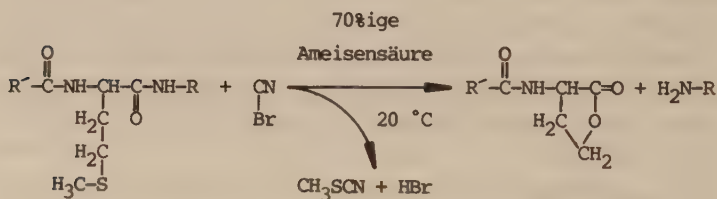


Abb. 4.6: Bromcianspaltung

Für die Spaltung mit Bromcyan wurden 300 nmol Schweine-Cu-Zn-SOD vom Blut mehrerer Schweine eingesetzt. Da die Schweine-Cu-Zn-SOD nur ein Methionin enthält (Tab. 4.1), werden bei der Spaltung mit Bromcyan zwei CB-Peptide erwartet. Die CB-Peptide werden mit der Gelfiltration (Abschnitt 3.9.1) getrennt. Als CB₁ wird das N-terminale Bromcyan-Peptid bezeichnet, welches Homoserin-Lakton anstatt Methionin enthält. Als CB₂ wird das C-terminale Brom-

cyan-Peptid bezeichnet, welches weder Methionin noch Homoserin-Lakton besitzt (Tab. 4.2). Das Homoserin-Lakton kann bei der Hydrolyse auch als Homoserin freigesetzt werden.

Identifiziert werden die beiden CB-Peptide nach der Gelfiltration durch Messungen der Absorption bei 280 nm Wellenlänge und Messungen der Radioaktivität des radioaktiv markierten S-Carboxymethylcysteins (Abschnitt 3.4). Das CB₁-Peptid zeigt eine hohe UV-Absorption bei 280 nm Wellenlänge, da seine Sequenz die beiden Tyrosine enthält /79/. Das Peptid CB₂ besitzt nur eine niedrige UV-Absorption und wurde deshalb mit Radioaktivitätsmessungen ermittelt. Das Diagramm der Trennung beider CB-Peptide ist in Abb. 4.7 dargestellt. Von beiden CB-Peptiden wurde eine Aminosäurenanalyse durchgeführt. Die Werte der Analyse und die Aminosäurenkomposition der Peptide sind in Tab. 4.2 aufgeführt.

Da die Sequenz des CB₂-Peptids aus 36 Aminosäuren aufgebaut ist (Tab. 4.2) und es sich bei dem N-Terminus des Peptids um eine Aminosäure handelt, die bei der Spaltung neu freigelegt wurde, wurde die Aminosäuresequenz des Peptids CB₂ mit der Sequenzanalyse (Abschnitt 3.10) vollständig ermittelt. 45 nmol Substanz von Peptid CB₂ wurden dafür verwendet. Die Sequenz des vollständigen Peptids konnte mit der C-terminalen Sequenzanalyse (Abschnitt 4.1.3) bestätigt werden.

Es wurde die folgende Sequenz für das Peptid CB₂ der Schweine-Cu-Zn-SOD ermittelt:

Val-Val-His-Glu-Lys-Pro-Asp-Asp-Leu-Gly-Arg-Gly-Gly-Asn-Glu-Glu-Ser-Thr-Lys-Thr-Gly-Asn-Ala-Gly-Ser-Arg-Leu-Ala-Cys-Gly-Val-Ile-Gly-Ile-Thr-Gln-OH

Für Peptid CB₁ konnte bei der N-terminalen Sequenzanalyse keine freie Aminosäure ermittelt werden (vgl. Abschnitt 4.1.2).

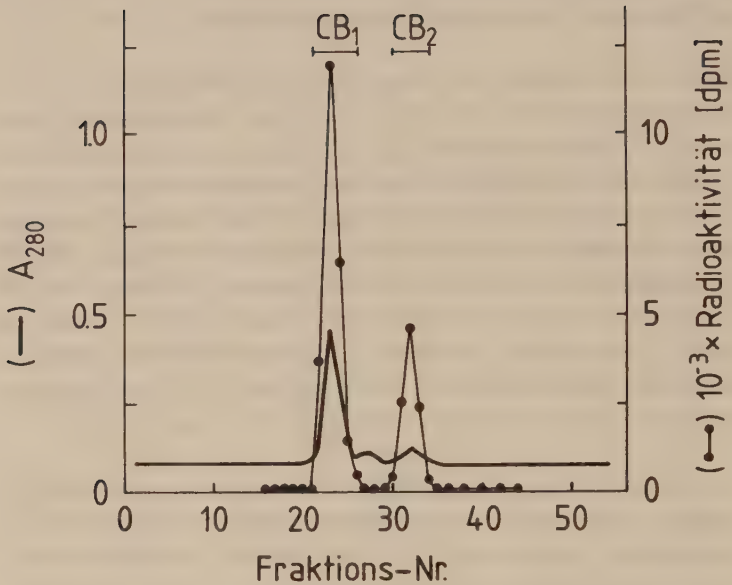


Abb. 4.7: Gelfiltration der Bromcyan-Peptide von Schweine-Cu-Zn-SOD über eine Biogel P10 Säule (2.8x50 cm). Die Peptide wurden mit Absorptionsmessungen bei 280nm Wellenlänge (—) und Radioaktivitätsmessungen der ¹⁴C markierten Cysteine mit einem Flüssigkeitsszintillationszähler (●—●) identifiziert. Die Fraktionen der Peptide CB₁ und CB₂, welche mit Balken gekennzeichnet sind, wurden gepoolt und der Sequenzanalyse unterzogen.

Aminosäure	CB1	CB2
Asx	11.5 (15)	4.0 (4)
Thr	9.3 (10)	2.6 (3)
Ser	5.2 (5)	2.3 (2)
Glx	9.9 (10)	4.2 (4)
Pro	4.2 (4)	1.3 (1)
Gly	18.2 (19)	7.3 (7)
Ala	7.3 (7)	2.3 (2)
Cys ^a	2.3 (2)	1.0 (1)
Val	12.0 (11)	2.6 (3)
Met		
Ile	5.2 (6)	1.5 (2)
Leu	6.2 (6)	2.1 (2)
Tyr	2.0 (2)	
Phe	4.0 (4)	
His	6.5 (7)	1.1 (1)
Lys	9.1 (9)	2.1 (2)
Arg	2.2 (2)	2.0 (2)
Hse + Hse ⁺	+	
Gesamtzahl	116	36
Position in der Sequenz	1 - 116	117 - 152

Tab. 4.2:

Ergebnisse der Aminosäurenanalysen der Peptide CB₁ und CB₂, welche bei der Spaltung der Schweine-Cu-Zn-SOD mit Bromcyan erhalten wurden. Die in Klammern angegebenen Werte für die Aminosäurenkomposition wurden aus der Sequenzanalyse erhalten. Die Zahlenwerte sind pro Molekül angegeben.

(a) als S-Carboxymethylcystein ermittelt.

(+) Anwesenheit wurde qualitativ überprüft.

4.1.6 Tryptische Peptide

Bei der Spaltung mit Trypsin handelt es sich um eine enzymatische Spaltung (Abschnitt 3.8.2). Das gereinigte Trypsin spaltet die Polypeptidketten spezifisch hinter den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin.

Um bei der Spaltung von 150 nmol Schweine-Cu-Zn-SOD vom Blut mehrerer Schweine auch überlappende Spaltpeptide zu erhalten, wurde eine unvollständige tryptische Spaltung durchgeführt, bei der nicht alle mit Trypsin spaltbaren Bindungen aufgetrennt wurden. Die Menge des Trypsins wurde dafür auf ein Enzym/Substratverhältnis von 1:200 reduziert und die Spaltung schon nach 1 Std. Inkubationszeit gestoppt. Bei der tryptischen Spaltung werden

mindestens 16 tryptische Peptide erwartet, weil die Aminosäurenanalyse der Schweine-Cu-Zn-SOD (Tab. 4.1) 11 Lysine und 4 Arginine aufweist. Die erhaltenen Spaltpeptide werden mit RP HPLC (Abschnitt 3.9.2) voneinander isoliert. Durch die unvollständige tryptische Spaltung wurden 22 tryptische Peptide erhalten.

Zur Sequenzermittlung jedes separierten tryptischen Peptids reicht die aufgetrennte Substanz eines chromatographischen Durchlaufs von etwa 10-15 nmol nicht aus. Da die Trennkapazität des HPLC-Gerätes begrenzt ist, wurden jeweils 6 chromatographische Läufe durchgeführt. Die hierbei zeitlich gleich laufenden und zurechenbaren Substanzen der Peaks wurden gepoolt. Weil am Anfang der chromatographischen Läufe sich die große Empfindlichkeit des HPLC-Gerätes gegen äußere Einflüsse besonders bemerkbar macht, erscheinen die Substanzen der Peaks dort nicht alle exakt zur gleichen Zeit und in gleicher Größenordnung. Um die Substanzen dennoch sicher poolen zu können, werden die Substanzen verschiedener Durchläufe mit der Dünnschichtchromatographie (Abschnitt 3.6) anhand ihres R_F -Wertes identifiziert und einander zugeordnet.

Ein HPLC-Diagramm der tryptisch gespaltenen carboxymethylierten Schweine-Cu-Zn-SOD vom Blut mehrerer Schweine ist in Abb. 4.8 dargestellt. Von etwa 3 nmol der Substanz jedes Peaks wurde eine Aminosäurenanalyse durchgeführt. Die Aminosäurenanalysen und die dazugehörigen Aminosäurenkompositionen (Tab. 4.3) zeigen, daß die tryptischen Spaltpeptide gut separiert wurden.

Von allen tryptischen Peptiden, welche in Abbildung 4.12 eingezeichnet sind, außer von Peptid T_4 , T_{14} und T_{15} , wurde eine Sequenzanalyse (Abschnitt 3.10) durchgeführt.

Bei der Einordnung der erhaltenen Peptidsequenzen in die vermeintliche Position bei der Schweine-Cu-Zn-SOD erwiesen sich die bekannten Sequenzen von Cu-Zn-Superoxid-Dismutasen anderer Säuge-

tiere als sehr hilfreich. Manche ermittelten Peptidsequenzen waren mit den bekannten völlig identisch, andere unterschieden sich nur in wenigen Aminosäuren.

Die ermittelten Sequenzen der tryptischen Peptide sind nachfolgend aufgelistet:

- Peptid T₁: Acetyl-Ala-Thr-Lys
Peptid T₂: Ala-Val-Cys-Val-Leu-Lys
Peptid T₂₋₆: Ala-Val-Cys-Val-Leu-Lys-Gly-Asp-Gly-Pro-Val-Gln-Gly-Thr-Ile-Tyr-Phe-Glu-Leu-Lys-Gly-Glu-Lys-Thr-Val-Leu-...
Peptid T₃: Gly-Asp-Gly-Pro-Val-Gln-Gly-Thr-Ile-Tyr-Phe-Glu-Leu-Lys
Peptid T₅: Thr-Val-Leu-Val-Thr-Gly-Thr-Ile-Lys
Peptid T_{5*}: Thr-Val-Val-Val-Thr-Gly-Thr-Ile-Lys
Peptid T₆: Gly-Leu-Ala-Glu-Gly-Asp-His-Gly-Phe-His-Val-His-Gln-Phe-Gly-Asp-Asn-Thr-Gln-Gly-Cys-Thr-Ser-Ala-Gly-Pro-His-Phe-Asn-Pro-Glx-Ser-Lys
Peptid T₇₋₉: Lys-His-Gly-Gly-Pro-Lys-Asp-Gln-Glu-Arg
Peptid T₁₀: His-Val-Gly-Asp-Leu-Gly-Asn-Val-Thr-Ala-Gly-Lys
Peptid T₁₀₋₁₁: His-Val-Gly-Asp-Leu-Gly-Asn-Val-Thr-Ala-Gly-Lys-Asp-Gly-Val-Ala-Thr-Val-Tyr-Ile...
Peptid T₁₁: Asp-Gly-Val-Ala-Thr-Val-Tyr-Ile-Glu-Asp-Ser-Val-Ile-Ala-Leu-Ser-Gly-Asp-His-Ser-Ile-Ile-Gly-Arg
Peptid T₁₂₋₁₃: Thr-Met-Val-Val-His-Glu-Lys-Pro-Asp-Asp-Leu-Gly-Arg
Peptid T₁₆: Leu-Ala-Cys-Gly-Val-Ile-Gly-Ile-Thr-Gln

Bei Position 31 des Peptids T₆ der Schweine-Cu-Zn-SOD konnte mit der Sequenzanalyse der tryptischen Peptide nicht eindeutig ermittelt werden, ob an dieser Stelle die Aminosäure Glutamin (Gln) oder Glutaminsäure (Glu) vorliegt. Von beiden Aminosäuren waren geringe Mengen sichtbar. Peptid T₁ wurde mit der C-terminalen Sequenzanalyse untersucht (Abschnitt 4.1.2).

Aminosäure	T1	T2	T2-4	T2 6	T3	T3-4	T4	T5	T5*	T6	T6-7
Asx			1.2 (1)	5.2 (5)	1.2 (1)	1.2 (1)				4.0 (4)	4.1 (4)
Thr	1.0 (1)		1.0 (1)	5.4 (6)	1.0 (1)	1.2 (1)		2.9 (3)	2.8 (3)	1.9 (2)	1.8 (2)
Ser				2.2 (2)						1.8 (2)	2.2 (2)
Glx			2.9 (3)	7.3 (7)	1.9 (2)	2.7 (3)	1.0 (1)			4.1 (4)	4.3 (4)
Pro			1.1 (1)	3.1 (3)	1.0 (1)	0.8 (1)				2.1 (2)	1.7 (2)
Gly			3.8 (4)	11.2 (11)	3.1 (3)	3.7 (4)	1.0 (1)	1.1 (1)	1.0 (1)	6.0 (6)	6.0 (6)
Ala	1.1 (1)	1.1 (1)	1.2 (1)	3.1 (3)						2.2 (2)	2.3 (2)
Cys ^a		1.0 (1)	0.9 (1)	1.9 (2)						1.1 (1)	1.0 (1)
Val		1.9 (2)	2.9 (3)	5.6 (6)	1.1 (1)	1.0 (1)		2.0 (2)	2.9 (3)	1.1 (1)	1.0 (1)
Met											
Ile			1.1 (1)	2.1 (2)	1.0 (1)	1.0 (1)		0.9 (1)	1.0 (1)		
Leu		1.1 (1)	2.2 (2)	3.9 (4)	1.1 (1)	1.2 (1)		1.1 (1)		1.2 (1)	1.1 (1)
Tyr			0.9 (1)	1.4 (1)	0.8 (1)	0.7 (1)					
Phe			1.0 (1)	3.8 (4)	0.9 (1)	0.8 (1)				3.0 (3)	2.9 (3)
His				3.8 (4)						3.5 (4)	3.5 (4)
Lys	0.9 (1)	1.0 (1)	2.8 (3)	5.1 (5)	1.0 (1)	1.0 (2)	1.0 (1)	0.9 (1)	1.3 (1)	1.1 (1)	2.0 (2)
Arg											
Trp											
Hsc + Hse [□]											
Gesamtzahl	3	6	23	65	14	17	3	9	9	33	34
Position in der Sequenz	1-3	4-9	4-26	4-68	10-23	10-26	24-26	27-35	27-35	36-68	36-69

Aminosäure	T7-9	T8-9	T10	T10-11	T11	T12-13	T12-14	T12-15	T14	T15	T16
Asx	1.1 (1)	1.0 (1)	2.0 (2)	4.9 (5)	3.1 (3)	1.9 (2)	3.0 (3)	4.0 (4)	1.0 (1)	1.0 (1)	
Thr			1.0 (1)	2.0 (2)	1.2 (1)	1.1 (1)	1.9 (2)	2.7 (3)	0.9 (1)	0.9 (1)	1.0 (1)
Ser				2.5 (3)	2.7 (3)		1.0 (1)	1.9 (2)	0.9 (1)	0.9 (1)	
Glx	2.0 (2)	2.0 (2)		1.4 (1)	1.8 (1)	1.2 (1)	3.1 (3)	3.3 (3)	2.2 (2)		1.1 (1)
Pro	1.0 (1)	1.0 (1)				1.0 (1)	1.1 (1)	1.1 (1)			
Gly	2.1 (2)	2.0 (2)	2.9 (3)	5.8 (6)	3.6 (3)	1.0 (1)	3.1 (3)	4.9 (5)	2.1 (2)	2.1 (2)	2.1 (2)
Ala			1.1 (1)	3.2 (3)	2.3 (2)			1.0 (1)		1.0 (1)	1.1 (1)
Cys ^a											1.0 (1)
Val			2.0 (2)	5.1 (5)	2.4 (3)	1.6 (2)	1.6 (2)	1.6 (2)			0.8 (1)
Met						1.0 (1)	0.9 (1)	1.1 (1)			
Ile				3.4 (4)	2.7 (4)						1.8 (2)
Leu			1.1 (1)	2.4 (2)	1.2 (1)	1.1 (1)	1.1 (1)	1.2 (1)			1.1 (1)
Tyr				1.1 (1)	0.9 (1)						
Phe											
His	1.0 (1)	0.9 (1)	0.9 (1)	1.8 (2)	1.3 (1)	0.9 (1)	1.3 (1)	1.4 (1)			
Lys	1.8 (2)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.3 (1)		1.1 (1)	1.9 (2)	2.1 (2)	1.1 (1)		
Arg	1.1 (1)	1.1 (1)		1.1 (1)	0.8 (1)	1.1 (1)	1.1 (1)	2.0 (2)		1.2 (1)	
Trp											
Hsc + Hse [□]											
Gesamtzahl	10	9	12	36	24	13	21	28	8	7	10
Position in der Sequenz	69-78	70-78	79-90	79-114	91-114	115-127	115-135	115-142	128-135	136-142	143-152

Tab. 4.3:

Ergebnisse der Aminosäureanalysen der T-Peptide aus der tryptischen Spaltung der Schweine-Cu-Zn-SOD. Die in Klammern angegebenen Werte für die Aminosäurenkomposition wurden aus der Sequenzanalyse erhalten. Die Zahlenwerte sind pro Molekül angegeben. Die Aminosäureanalyse von Peptid T₅* zeigt die Punktmutation in Peptid T₅ (Leu→Val).

(a) als S-Carboxymethylcystein ermittelt.

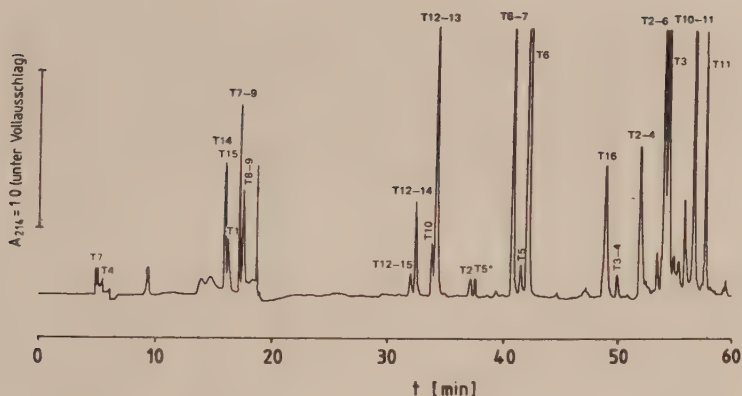


Abb. 4.8: Trennung der Peptide von tryptisch gespalteener carboxymethylierter Schweine-Cu-Zn-SOD mit RP HPLC. Die T-Peptide wurden in Anlehnung an ihre Reihenfolge in der Sequenz (Abb. 4.12) bezeichnet. * kennzeichnet die Punktmutation in Peptid T₅ (Leu→Val).

Als Peptid T₅ wurden zwei verschiedene tryptische Peptide ermittelt. Sie sind in Abb. 4.8 dargestellt. Die Sequenz der beiden Peptide T₅ zeigte eine Substitution von Leucin für Valin an der 3. Position in dem Verhältnis 2:1. Das Peptid, welches Leucin an seiner 3. Position besitzt, wird T₅, das Peptid, welches an dieser Stelle Valin besitzt, wird T₅* genannt.

Um das Vorkommen der beiden verschiedenen Peptide T₅ und T₅* im gepoolten Blut mehrerer Schweine zu bestätigen, wurden zusätzlich 300 nmol Schweine-Cu-Zn-SOD tryptisch gespalten (Abschnitt 3.8.2) und die Spaltpeptide mit RP HPLC (Abschnitt 3.9.2) separiert. Um die Peptide dieser Cu-Zn-SOD (RCM^a) besser isolieren zu können und möglichst wenig überlappende Peptide zu erhalten, wurde eine vollständige Spaltung durchgeführt. Von den Substanzen der Peaks, welche zu den bekannten Retentionszeiten der Peptide T₅ im HPLC-Chromatogramm (vgl. Abb. 4.9) auftraten, wurden Aminosäurenanalysen (vgl. Tab. 4.4) durchgeführt.

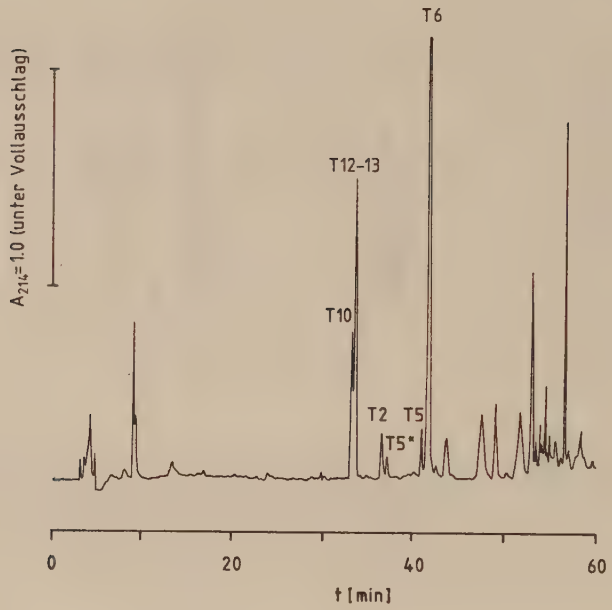


Abb. 4.9

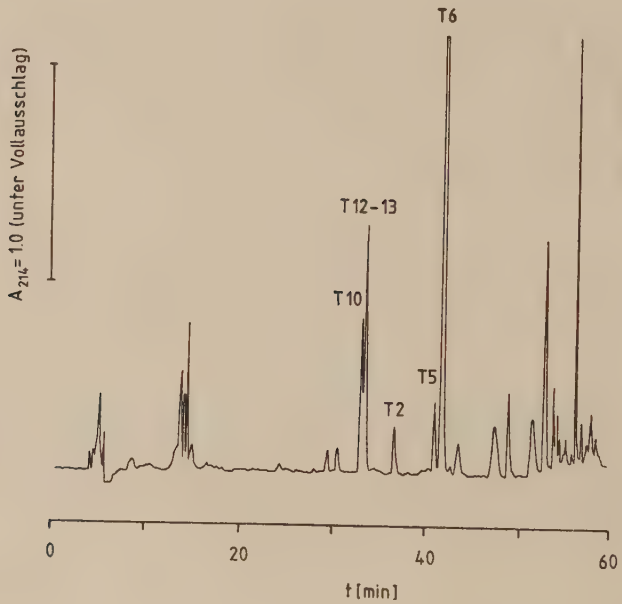


Abb. 4.10

Zur Untersuchung der tryptischen Peptide von 350 nmol der Cu-Zn-SOD vom Blut eines Schweines (RCM^b) wurde die SOD unter gleichen Bedingungen wie die RCM^a vom Blut mehrerer Schweine vorbereitet. Von einigen Substanzen der Peaks, welche im Bereich der bekannten Retentionszeiten der Peptide T₅ im HPLC-Chromatogramm (vgl. Abb. 4.10) erschienen, wurden Aminosäureanalysen (vgl. Tab. 4.5) durchgeführt.

Beim Vergleich der beiden HPLC-Chromatogramme von tryptisch gespaltenem RCM^a und RCM^b erschienen die verschiedenen Peaks zu vergleichbarer Retentionszeit jeweils in gleicher Größe. Das HPLC-Chromatogramm vom Blut mehrerer Schweine und die Aminosäureanalysen bestätigen das gleichzeitige Auftreten von Peptid T₅ und T₅*. Im HPLC-Chromatogramm und bei den Aminosäureanalysen der SOD vom Blut eines Schweines wird nur ein Peptid T₅ gefunden, welches wie das Peptid T₅ vom Blut mehrerer Schweine ein Leucin aufweist. In der Aminosäureanalyse ist der Wert für Valin entsprechend um eine Aminosäure geringer.

Abb. 4.9: Trennung der Peptide von tryptisch gespaltenen Cu-Zn-SOD (RCM^a) vom Blut mehrerer Schweine mit RP HPLC. Die Peptide T₅ und T₅* wurden mit Aminosäureanalysen identifiziert (vgl. Tab. 4.4). * kennzeichnet die Punktmutation in Peptid T₅ (Leu→Val). Die Peptide T₂, T₆, T₁₀ und T₁₂₋₁₃ wurden durch Vergleich mit Abb. 4.10 bezeichnet.

Abb. 4.10: Trennung der Peptide von tryptisch gespaltenen Cu-Zn-SOD (RCM^b) vom Blut eines Schweines mit RP HPLC. Das Peptid T₅ und die Peptide T₂, T₆, T₁₀ und T₁₂₋₁₃ wurden durch Aminosäureanalysen identifiziert (vgl. Tab. 4.5).

Aminosäure	T5*	T5
Thr	2.8 (3)	2.8 (3)
Gly	1.2 (1)	1.1 (1)
Val	2.9 (3)	2.1 (2)
Ile	0.9 (1)	1.0 (1)
Leu		1.1 (1)
Lys	1.2 (1)	1.1 (1)
Gesamtzahl	9	9
Position in der Sequenz	27 - 35	27 - 35

Tab. 4.4:

Aminosäurenanalysen der Peptide T₅ und T₅* aus der tryptischen Spaltung der Cu-Zn-SOD (RCM^a) vom Blut mehrerer Schweine. Die in Klammern angegebenen Werte für die Aminosäurenkomposition wurden aus der Sequenzanalyse erhalten. Die Zahlenwerte sind pro Molekül angegeben.

Aminosäure	T2	T5	T6	T10	T12-13
Asx			4.0 (4)	1.9 (2)	2.0 (2)
Thr		2.8 (3)	2.1 (2)	1.1 (1)	1.1 (1)
Ser			2.0 (2)		
Glx			4.3 (4)		1.1 (1)
Pro			2.4 (2)		1.0 (1)
Gly		1.2 (1)	6.0 (6)	3.2 (3)	1.1 (1)
Ala	1.1 (1)		2.4 (2)	1.5 (1)	
Cys ^a	1.0 (1)		1.1 (1)		
Val	1.9 (2)	2.2 (2)	1.2 (1)	1.8 (2)	1.7 (2)
Met					0.9 (1)
Ile		0.9 (1)			
Leu	1.0 (1)	1.0 (1)	1.1 (1)	1.0 (1)	1.1 (1)
Tyr					
Phe			2.9 (3)		
HIs			2.6 (4)	0.9 (1)	0.9 (1)
Lys	1.0 (1)	0.8 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Arg					1.0 (1)
Gesamtzahl	6	9	33	12	13
Position in der Sequenz	4 - 9	27 - 35	36 - 68	79 - 90	115 - 127

Tab. 4.5:

Aminosäurenanalysen des Peptids T₅ und der Peptide T₂, T₆, T₁₀ und T₁₂₋₁₃ aus der tryptischen Spaltung der Cu-Zn-SOD (RCM^b) vom Blut eines Schweines. Die in Klammern angegebenen Werte für die Aminosäurenkomposition wurden aus der Sequenzanalyse erhalten. Die Zahlenwerte sind pro Molekül angegeben.

(a) als S-Carboxymethylcystein ermittelt

4.1.7 Peptide der Spaltung mit

Staphylokokkus aureus Proteinase V8

Staphylokokkus aureus Proteinase V8 spaltet Peptidbindungen spezifisch auf der C-terminalen Seite der Glutaminsäure, gelegentlich auch auf der C-terminalen Seite von Asparaginsäure.

Für die Spaltung (Abschnitt 3.8.3) wurden 200 nmol carboxymethylierte Schweine-Cu-Zn-SOD eingesetzt. Die Spaltpeptide wurden mit RP HPLC (Abschnitt 3.9.2) aufgetrennt und isoliert. Um genügend separierte Peptidsubstanz für die Sequenzanalyse (Abschnitt 3.10) zu erhalten, wurden 5 chromatographische Läufe durchgeführt, welche jeweils 12 nmol aufgetrennte Substanz lieferten. Ein HPLC-Chromatogramm der gespaltenen Schweine-SOD ist in Abbildung 4.11. wiedergegeben. Von der Substanz jedes Peaks wurde eine Aminosäurenanalyse durchgeführt. Die Werte dieser Analysen und die Aminosäurenkomposition sind in Tabelle 4.6 aufgelistet. Es wurden die Sequenzen der Peptide E₂, E₃, E₅, E₆ und E₇ analysiert.

Die Anbindungsrate der C-terminalen Glutaminsäure bei der Sequenzanalyse ist besonders hoch, da diese im Gegensatz zu Lysin oder Arginin, welche bei der tryptischen Spaltung am C-terminalen Ende der Peptide liegen, zwei Carboxylgruppen aufweist, die an die feste Phase anbinden können (Abschnitt 3.10.2). Wegen der hohen Anbindungsrate ist die Sequenz der Peptide gut zu bestimmen. Die Abspaltung der Glutaminsäure von der festen Phase ist aus dem gleichen Grunde aber schwierig, so daß sie selbst bei der Sequenzanalyse schlechter erkennbar ist.

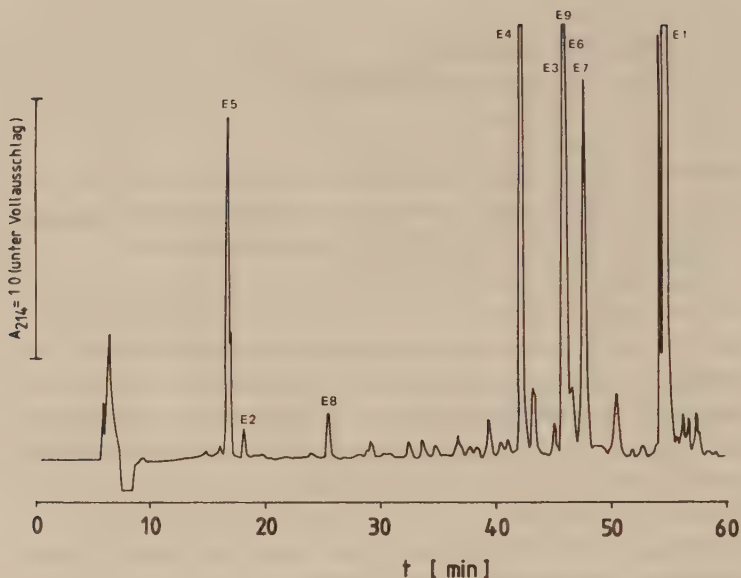


Abb. 4.11: Trennung der E-Peptide mit RP HPLC, welche bei der Spaltung von carboxymethylierter Schweine-Cu-Zn-SOD mit *Staphylokokkus aureus* Proteinase V8 erhalten wurden. Die E-Peptide wurden in Anlehnung an ihre Reihenfolge in der Sequenz (Abb. 4.12) bezeichnet.

Die ermittelten Sequenzen der Peptide lauten:

Peptid E₂: Leu-Lys-Gly-Glu

Peptid E₃: Lys-Thr-Val-Leu-Val-Thr-Gly-Thr-Ile-Lys-Gly-Leu-Ala-Glu

Peptid E₅: Ser-Lys-Lys-His-Gly-Gly-Pro-Lys-Asp-Gln-Glu

Peptid E₆: Arg-His-Val-Gly-Asp-Leu-Gly-Asn-Val-Thr-Ala-Gly-Lys-Asp-Gly-Val-Ala-Thr-Val-Tyr-Ile-Glu

Peptid E₇: Asp-Ser-Val-Ile-Ala-Leu-Ser-Gly-Asp-His-Ser-Ile-Ile-Gly-Arg-Thr-Met-Val-Val-His-Glu

Aminosäure	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9
Asx	1.1 (1)			4.1 (4)	1.4 (1)	3.3 (3)	2.1 (2)	2.9 (3)	1.1 (1)
Thr	1.8 (2)		3.0 (3)	1.8 (2)		2.0 (2)	1.2 (1)		3.0 (3)
Ser				1.0 (1)	0.9 (1)		3.4 (3)		1.8 (2)
Glx	2.2 (2)	1.1 (1)	1.1 (1)	3.1 (3)	1.9 (2)	1.1 (1)	1.1 (1)	2.3 (2)	1.1 (1)
Pro	1.0 (1)			2.1 (2)	1.0 (1)			0.9 (1)	
Gly	3.1 (3)	1.1 (1)	1.9 (2)	4.8 (5)	2.1 (2)	3.9 (4)	2.2 (2)	3.1 (3)	3.9 (4)
Ala	2.1 (2)		0.9 (1)	1.0 (1)		1.7 (2)	1.0 (1)		1.7 (2)
Cys ^a	1.0 (1)			1.1 (1)					1.0 (1)
Val	2.7 (3)		1.7 (2)	1.3 (1)		3.5 (4)	2.2 (3)		0.9 (1)
Met							0.9 (1)		
Ile	1.0 (1)		0.8 (1)			0.8 (1)	2.0 (3)		1.6 (2)
Leu	1.1 (1)	0.9 (1)	1.8 (2)			0.9 (1)	0.8 (1)	1.0 (1)	0.9 (1)
Tyr	1.0 (1)					1.0 (1)			
Phe	1.0 (1)			3.0 (3)					
His				3.8 (4)	1.2 (1)	1.4 (1)	2.4 (2)		
Lys	2.0 (2)	0.9 (1)	2.2 (2)		2.5 (3)	1.1 (1)		1.0 (1)	1.1 (1)
Arg						0.9 (1)	0.8 (1)	0.9 (1)	0.9 (1)
Gesamtzahl	21	4	14	27	11	22	21	12	20
Position in der Sequenz	1 - 21	22 - 25	26 - 39	40 - 66	67 - 77	78 - 99	100 - 120	121 - 132	133 - 152

Tab. 4.6: Aminosäurenanalysen der E-Peptide, welche bei der Spaltung der Schweine-Cu-Zn-SOD mit Staphylokokkus aureus Proteinase V8 erhalten wurden. Die in Klammern angegebenen Werte für die Aminosäurenkomposition wurden aus der Sequenzanalyse erhalten. Die Zahlenwerte sind pro Molekül angegeben.

(a) als S-Carboxymethylcystein ermittelt.

4.1.8 Primärstruktur der Schweine-Cu-Zn-SOD

In Abbildung 4.12 ist die komplette Primärstruktur der Schweine-Cu-Zn-SOD wiedergegeben, die über die eingezeichneten Peptide belegt wurde. Diese geben auch einen Überblick über die Sequenzierungsstrategie. Die Aminosäuren, eine Asparaginsäure und sechs Histidine, welche das Kupfer und das Zink bei der Rinder-SOD binden, wurden an homologen Positionen gefunden: Asp⁸² und His⁴⁵, His⁴⁷, His⁶², His⁷⁰, His⁷⁹ und His¹¹⁹.

4.2 Hefe-Cu-Zn-SOD

Für die proteinchemische Enzymcharakterisierung der Hefe-Cu-Zn-SOD standen 10 mg gereinigte Substanz zur Verfügung. Sie wurde aus der Hefeart *Saccharomyces cerevisiae* (obergärige Bierhefe), welche auch zur Preßhefeherstellung (Bäckerhefe) verwendet wird /59/, gewonnen.

4.2.1 Aminosäurezusammensetzung der Hefe-Cu-Zn-SOD

Die Hefe-Cu-Zn-SOD besitzt wie die Schweine-Cu-Zn-SOD zwei durch intramolekulare Bindungen (Abschnitt 4.1.1) miteinander verbundene identische Untereinheiten, welche jeweils eine Disulfidbindung besitzen /33,71/. Diese Bindungen werden für die Sequenzanalyse durch Reduktion und S-Carboxymethylierung getrennt und die SOD dabei gleichzeitig radioaktiv markiert (Abschnitt 3.4).

Nach der S-Carboxymethylierung wurden 280 nmol Hefe-Cu-Zn-SOD erhalten. Zur Ermittlung der Aminosäurezusammensetzung wurde eine Analyse der SOD durchgeführt. Die Werte der Analyse und die Aminosäurenkomposition sind in Tabelle 4.7 aufgelistet.

Die komplette Primärstruktur der Hefe-Cu-Zn-SOD besteht aus 153 Aminosäuren. Kennzeichnend für sie sind ein Tyrosin, ein Cystin /33/, welches bei der Aminosäurenanalyse als zwei S-Carboxymethylcysteine ermittelt wurde, ein Methionin, vier Arginine und zehn Lysine. Aus der Sequenz kann man eine relative Molekülmasse von 15721 Da errechnen.

Aminosäure	Hefe-SOD
Asx	17.3 (17)
Thr	10.0 (10)
Ser	10.5 (11)
Glx	14.0 (13)
Pro	5.4 (8)
Gly	22.1 (22)
Ala	15.4 (15)
Cys ^a	2.1 (2)
Val	13.7 (17)
Met	1.1 (1)
Ile	5.3 (6)
Leu	6.6 (6)
Tyr	1.3 (1)
Phe	6.4 (6)
His	5.4 (6)
Lys	9.8 (10)
Arg	4.0 (4)
Gesamtzahl	153

Tab. 4.7:

Aminosäurenanalyse der Hefe-Cu-Zn-SOD. Die in Klammern angegebenen Werte für die Aminosäurenkomposition wurden aus der Sequenzanalyse erhalten. Die Zahlenwerte sind pro Molekül angegeben.

(a) als S-Carboxymethylcystein ermittelt.

4.2.2 N-Terminus der Hefe-Cu-Zn-SOD

Bei der N-terminalen Sequenzanalyse (Abschnitt 3.10) der Hefe-Cu-Zn-SOD wurden die Aminosäuren sukzessiv abgespalten. Die ersten zehn Aminosäuren der Sequenz wurden analysiert.

Die SOD besitzt einen freien N-Terminus, die ermittelte Sequenz lautet:

Val-Gln-Ala-Val-Ala-Val-Leu-Lys-Gly-Asp-...

4.2.3 Spaltungen und Sequenzierungsstrategie

Die Sequenz einer Hefe-Cu-Zn-SOD Untereinheit ist aus 153 Aminosäuren aufgebaut (Abschnitt 4.2.1). Da das Polypeptid zu lang ist, um die Sequenz direkt vollständig zu analysieren (Abschnitt 3.10), wird es zunächst in Peptide gespalten. Die Sequenz der Spaltpeptide wird einzeln ermittelt. Ihre Reihenfolge wird durch Vergleich mit den Ergebnissen anderer Autoren /33,71/ über die Hefe-SOD zur kompletten Sequenz der Hefe-SOD zusammengesetzt. Der Gehalt an Lysin und Arginin von 9.2 % des Gesamtaminosäuregehalts der Hefe-SOD (vgl. Tab. 4.7) ließ eine Spaltung mit Trypsin sinnvoll erscheinen. Zusätzlich sollte eine Spaltung mit Hydroxylamin durchgeführt werden.

4.2.4 Tryptische Peptide

Mit gereinigtem Trypsin, welches Peptidbindungen auf der C-terminalen Seite von Lysin und Arginin aufbricht, wurden 280 nmol Hefe-Cu-Zn-SOD gespalten (Abschnitt 3.8.2). Die Menge des Trypsins wurde auf das Enzym/Substratgewichtsverhältnis von 1:200 eingestellt, die Spaltungszeit betrug etwa 17 Std. Zur Auftrennung der gespaltenen Substanz wurden 6 Läufe mit RP HPLC durchgeführt (Abschnitt 3.9.2). Abbildung 4.13 zeigt ein HPLC-Chromatogramm der tryptisch gespaltenen Hefe-Cu-Zn-SOD. Von der Substanz jedes Peaks wurde eine Aminosäurenanalyse angefertigt. Die Werte der Analysen und die Aminosäurenkomposition sind in Tabelle 4.8 aufgeführt.

Die Analysen der tryptischen Peptide zeigen, daß die Peptide gut getrennt und isoliert wurden, aber nicht alle mit Trypsin spaltbaren Bindungen aufgebrochen wurden. Da die Sequenz vier Arginine und zehn Lysine aufweist (vgl. Tab. 4.7), wurden mindestens 15 tryptische Peptide erwartet. Tatsächlich wurden 17 Peptide erhalten. Die Aminosäuren jedes Peptids wurden mit dem Festphasensequenzator sukzessiv abgespalten und anschließend nachgewiesen

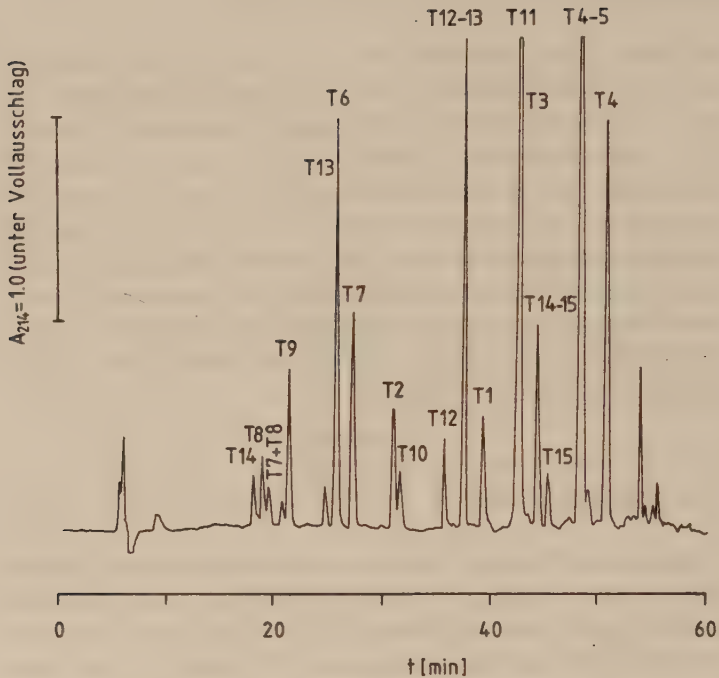


Abb. 4.13: Trennung der Peptide von tryptisch gespaltener carboxymethylierter Hefe-Cu-Zn-SOD mit RP HPLC. Die T-Peptide wurden in Anlehnung an ihre Reihenfolge in der Sequenz (Abb. 4.18) bezeichnet.

(Abschnitt 3.10). Das Peptid T₈ wurde zusätzlich mit einem Flüssigphasensequenator mit anschließender Identifizierung der Aminosäuren über ein HPLC-System untersucht. Die ermittelten Peptidsequenzen konnten durch Vergleich mit bekannten Sequenzen der Hefe-Cu-Zn-SOD /33,71/ in ihre Position in der Sequenz eingeordnet werden. Folgende Peptidsequenzen wurden ermittelt:

- Peptid T₁: Val-Gln-Ala-Val-Ala-Val-Leu-Lys
- Peptid T₂: Gly-Asp-Ala-Gly-Val-Ser-Gly-Val-Val-Lys
- Peptid T₃: Phe-Glu-Gln-Ala-Ser-Glu-Ser-Glu-Pro-Thr-Thr-Val-Ser-Tyr-Glu-Ile-Ala-Gly-Asn-Ser-Pro-Asn-Ala-Glu-Arg
- Peptid T₄: Gly-Phe-His-Ile-His-Glu-Phe-Gly-Asp-Ala-Thr-(Asn)-Gly-Cys-Val-Ser-Ala-Gly-Pro-His-...
1 Asx, 1 Pro, 2 Phe, 1 Lys
- Peptid T₄₋₅: Gly-Phe-His-Ile-His-Glu-Phe-Gly-Asp-Ala-Thr-(Asn)-Gly-Cys-Val-Ser-Ala-Gly-Pro-His-...
1 Asx, 1 Pro, 2 Phe, 2 Lys
- Peptid T₆: Thr-His-Gly-Ala-Pro-Thr-Asp-Glu-Val-Arg
- Peptid T₇: His-Val-Gly-Asp-Met-Gly-Asn-Val-Lys
- Peptid T₈: Thr-Asp-Glu- (Asn) -Gly-Val-Ala-Lys
- Peptid T₉: Gly-Ser-Phe-Lys
- Peptid T₁₀: Asp-Ser-Leu-Ile-Lys
- Peptid T₁₁: Leu-Ile-Gly-Pro-Thr-Ser-Val-Val-Gly-Arg
- Peptid T₁₂: Ser-Val-Val-Ile-His-Ala-Gly-Gln-Asp-Asp-Leu-Gly-Lys
- Peptid T₁₂₋₁₃: Ser-Val-Val-Ile-His-Ala-Gly-Gln-Asp-Asp-Leu-Gly-Lys-Gly-Asp-Thr-Glu-Glu-Ser-Leu-Lys
- Peptid T₁₃: Gly-Asp-Thr-Glu-Glu-Ser-Leu-Lys
- Peptid T₁₄: Thr-Gly-Asn-Ala-Gly-Pro-Arg
- Peptid T₁₄₋₁₅: Thr-Gly-Asn-Ala-Gly-Pro-Arg-Pro-Ala-Cys-Gly-Val-Ile-Gly-Leu-Thr-Asn
- Peptid T₁₅: Pro-Ala-Cys-Gly-Val-Ile-Gly-Leu-Thr-Asn

Die Aminosäure Asparagin, welche an Position 12 des Peptids T₄ und T₄₋₅ und an Position 4 des Peptids T₈ vorliegt, ist in Klammern angegeben, da an diesen Positionen bei der Identifizierung der Aminosäuren (Abschnitt 3.10.3) etwas Asparagin, aber auch geringe Mengen der Asparaginsäure sichtbar waren. Die Menge der nachweisbaren Aminosäuren war jeweils ab dieser Position so stark reduziert, daß der Verlust auf mehr als 90 % abgeschätzt wurde. Trotz dieses Substanzverlustes konnten von den Peptiden T₄ und

Aminosäure	T1	T2	T3	T4	T4-5	T6	T7	T8	T9
Asx		1,2 (1)	2,0 (2)	3,1 (3)	3,0 (3)	1,0 (1)	2,1 (2)	1,9 (2)	
Thr			1,8 (2)	1,1 (1)	1,1 (1)	1,6 (2)		0,9 (1)	
Ser		1,1 (1)	3,1 (4)	1,4 (1)	1,2 (1)				0,9 (1)
Glx	1,3 (1)		5,7 (6)	1,5 (1)	1,3 (1)	1,0 (1)		1,0 (1)	
Pro			2,1 (2)	1,9 (2)	2,2 (2)	1,0 (1)			
Gly		3,2 (3)	1,0 (1)	4,1 (4)	4,1 (4)	1,2 (1)	2,3 (2)	1,1 (1)	1,2 (1)
Ala	2,1 (2)	1,3 (1)	3,2 (3)	2,0 (2)	2,3 (2)	1,2 (1)		1,1 (1)	
Cys ^a				0,9 (1)	1,0 (1)				
Val	2,8 (3)	2,3 (3)	0,8 (1)	1,3 (1)	1,1 (1)	1,0 (1)	1,9 (2)	1,0 (1)	
Met							0,9 (1)		
Ile			0,9 (1)	0,8 (1)	0,9 (1)				
Leu	1,0 (1)								
Tyr			1,0 (1)						
Phe			1,0 (1)	3,8 (4)	3,7 (4)				1,0 (1)
His				2,4 (3)	2,3 (3)	0,9 (1)	0,9 (1)		
Lys	0,9 (1)	0,9 (1)		0,9 (1)	1,8 (2)		0,9 (1)	0,9 (1)	0,9 (1)
Arg			1,0 (1)			1,0 (1)			
Gesamtzahl	8	10	25	25	26	10	9	8	4
Position in der Sequenz	1 - 8	9 - 18	19 - 43	44 - 68	44 - 69	70 - 79	80 - 88	89 - 96	97 - 100

Aminosäure	T10	T11	T12	T12-13	T13	T14	T14-15	T15
Asx	1,2 (1)		1,7 (2)	2,9 (3)	0,9 (1)	1,0 (1)	2,0 (2)	1,0 (1)
Thr		0,9 (1)		1,0 (1)	0,8 (1)	0,9 (1)	1,8 (2)	0,7 (1)
Ser	0,9 (1)	0,8 (1)	1,4 (1)	2,0 (2)	1,3 (1)			
Glx			1,3 (1)	3,1 (3)	1,9 (2)			
Pro		1,0 (1)				1,0 (1)	1,9 (2)	0,9 (1)
Gly		1,9 (2)	2,3 (2)	3,3 (3)	1,3 (1)	2,1 (2)	4,0 (4)	2,4 (2)
Ala			1,0 (1)	1,3 (1)		1,1 (1)	2,2 (2)	0,9 (1)
Cys ^a							1,1 (1)	0,9 (1)
Val		1,6 (2)	1,2 (2)	1,5 (2)			0,9 (1)	0,8 (1)
Met								
Ile	0,9 (1)	0,9 (1)	0,6 (1)	0,8 (1)			0,7 (1)	0,5 (1)
Leu	1,1 (1)	1,0 (1)	0,8 (1)	1,9 (2)	1,0 (1)		1,1 (1)	1,1 (1)
Tyr								
Phe								
His			0,8 (1)	0,9 (1)				
Lys	0,9 (1)		0,7 (1)	1,6 (2)	0,8 (1)			
Arg		1,0 (1)				0,9 (1)	1,0 (1)	
Gesamtzahl	5	10	13	21	8	7	17	10
Position in der Sequenz	101 - 105	106 - 115	116 - 128	116 - 136	129 - 136	137 - 143	137 - 153	144 - 153

Tab. 4.8:

Aminosäurenanalysen der T-Peptide aus der tryptischen Spaltung der Hefe-Cu-Zn-SOD. Die in Klammern angegebenen Werte für die Aminosäurenkomposition wurden aus der Sequenzanalyse erhalten. Die Zahlenwerte sind pro Molekül angegeben.

(a) als S-Carboxymethylcystein ermittelt.

T₄₋₅ die Aminosäuren bis einschließlich der Position 20 bestimmt werden. Das radioaktiv markierte S-Carboxymethylcystein an Position 14 wurde durch Ermittlung der Zählraten (Abschnitt 3.10.3) identifiziert. Die bis zum C-Terminus der Peptide noch fehlende Sequenz konnte als Aminosäurenkomposition mit Hilfe der Aminosäurenanalysen (vgl. Tab. 4.8) angegeben werden. Von Peptid T₈ konnten die Aminosäuren bis zum C-Terminus ermittelt werden. Der große Verlust der nachzuweisenden Aminosäuren ist charakteristisch für die Sequenzanalyse bei einer Asparaginyl-Glycin-Bindung /6,29,33/. Die Annahme, daß diese Verbindung hier vorliegt, wird dadurch bestätigt, daß geringe Mengen Asparagin und nach diesen Positionen jeweils Glycin festgestellt wurden.

Zur Überprüfung, ob dieser Ausbeuteverlust bei einer Asparaginyl-Glycin-Bindung auch bei der Sequenzermittlung mit einem Flüssigphasensequenator (890 C Beckman, Palo Alto) auftritt, wurde das Peptid T₈ zusätzlich mit dieser Methode untersucht. Da zur Sequenzanalyse mindestens 15 nmol reine Substanz benötigt werden, aber die Substanz von Peptid T₈ nur noch zusammen mit T₇ vorhanden war (Abb. 4.13), mußte das Peptid T₈ erst isoliert werden. Die Substanzen von 6 chromatographischen Läufen wurden gepoolt und erneut über RP HPLC aufgetrennt. Da aber die Substanzen von Peptid T₇ und T₈ zu eng beieinander liegen (Abb. 4.13), um bei der RP HPLC (Abschnitt 3.9.2) gut aufgetrennt zu werden, wurde ein flacherer Anstieg des Gradienten für Lösungsmittel B für die Trennung eingesetzt. Der lineare Gradient stieg in der Zeit von 0 bis 40 min auf 10 % Lösung B in Lösung A und erreichte linear bei 65 min den Gradienten von 60 % Lösung B in Lösung A. In Abbildung 4.14 ist ein HPLC-Chromatogramm dieser Trennung dargestellt. Die Identität und die Reinheit des Peptids T₈ wurde mit Dünnschichtchromatographie (Abschnitt 3.6) überprüft.

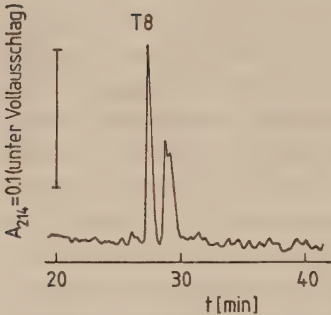


Abb. 4.14:

Isolierung des Peptids T_8
aus $T_7 + T_8$ (Abb. 4.13) mit
RP HPLC.

15 nmol des reinen Peptids T_8 wurden zur Sequenzanalyse mit dem Flüssigphasensequenator eingesetzt. (Die Untersuchung wurde am Institut für Physiologische Chemie der RWTH Aachen durchgeführt.) Die sukzessiv vom N-Terminus abgespaltenen Aminosäuren wurden als PTH-Aminosäuren mit einem HPLC-System (Spektraphysis SP 8000) identifiziert.

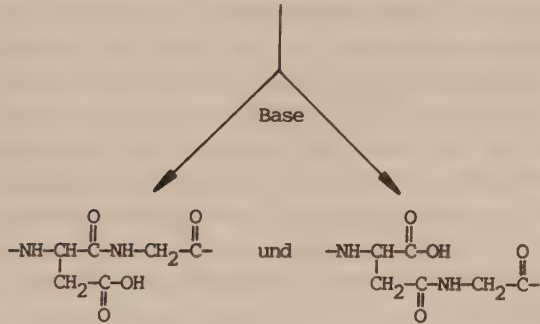
Der Ausbeuteverlust, der bei der Sequenzanalyse mit einem Festphasensequenator bei den abgespaltenen Aminosäuren nach einer Asn-Gly Verbindung auftrat, ist auch hier vorhanden. Bis zum Abbauschritt 4 werden 15 nmol der Aminosäuren nachgewiesen. Ab dieser Position sind noch 15 pmol der Aminosäuren vorhanden. Diese Menge reicht gerade noch aus, um die abgespaltenen Aminosäuren zu erkennen. Bei Position 4 waren auch hier geringe Mengen Asparagin, aber auch etwas Asparaginsäure feststellbar. Die Sequenz stimmt mit der bereits ermittelten überein und lautet:

Thr-Asp-Glu-(Asn)-Gly-Val-Ala-Lys

Die Verwendung eines Fest- oder Flüssigphasensequenators hat also keinen meßbaren Einfluß auf die Reduzierung der Menge nachgewiesener Aminosäuren.



Asparaginyll-Glycin $\longrightarrow$ Anhydroasparaginsäure-Glycin
(zyklisches Imid)



α -Asparaginsäure-Glycin β -Asparaginsäure-Glycin

Abb. 4.15: Reaktion der Asparaginyll-Glycin-Bindung zum zyklischen Imid und zur α - und β -Asparaginsäure-Glycin-Verbindung.

Solche Probleme beim Auftreten einer Asparaginyll-Glycin-Bindung wurden von vielen Autoren festgestellt. Oft sinkt die Ausbeute des Asparagins und die der nachfolgenden Aminosäuren beim Edman-Abbau um 50-75 % oder mehr /6,29,33/. Die Ursache für den Verlust der Aminosäuren ist die Bildung eines zyklischen Imids /4,6/, welches bei Zyklisierung der Asparaginseitenkette mit dem nachfolgenden Glycinamidstickstoff in der Polypeptidkette gebildet wird. Molekulare Modelle demonstrieren, daß die Zyklisierung der

Asparaginseitenkette nur bei der nachfolgenden Aminosäure Glycin erfolgt, jedoch bei Anwesenheit einer Seitenkette der nachfolgenden Aminosäure sterisch gehindert wird /4/. Das zyklische Imid ist für den Edman-Abbau nicht zugänglich, seine Bildung wird bei jedem Abbauschritt im Sequenator durch Behandlung mit warmer Säure katalysiert /29/. Wird die Sequenz eines solchen Peptids mit Hilfe des Edman-Abbaus analysiert, so können an der Position des Asparagin sowohl geringe Mengen PTH-Asparagin als auch PTH-Asparaginsäure nachgewiesen werden. Falls sich bei dieser Asparaginyl-Glycin-Bindung kein zyklisches Imid gebildet hat, so wird PTH-Asparagin nachgewiesen. Hat sich aber ein zyklisches Imid gebildet und wird dieses mit einer Base behandelt, so spaltet es auf und man erhält zwei Produkte, eine α -Asparaginsäure-Glycin-Verbindung, welche dem Edman-Abbau zugänglich ist, und eine β -Asparaginsäure-Glycin-Verbindung. Beim Edman-Abbau dieser Verbindung wird PTH-Asparaginsäure nachgewiesen. In Abbildung 4.15 ist die Reaktion der Asparaginyl-Glycin-Bindung zum zyklischen Imid und zur α - und β -Asparaginsäure-Glycin Verbindung dargestellt /4/.

4.2.5 Hydroxylaminspaltung

Um bei der Sequenzanalyse von Peptiden, welche eine Asparaginyl-Glycin-Bindung besitzen, den Verlust der abgespaltenen Aminosäurenmengen zu vermeiden, soll diese Verbindung gespalten werden. Hydroxylamin spaltet unter alkalischen Bedingungen von pH 9 durch nukleophilen Angriff das bei dieser Aminosäurenkombination häufig gebildete zyklische Imid, welches für den Edman-Abbau nicht zugänglich ist /4,6/. Es handelt sich hier um eine chemische Spaltung, bei der am C-terminalen Ende des neuen Spaltpeptids eine Mischung aus α - und β -Asparaginsäure-Hydroxamat und am N-terminalen Ende des anderen Spaltpeptids Glycin vorliegt. Die Sequenz dieser entstandenen Spaltpeptide kann nun getrennt analysiert werden. Die Spaltung der Asparaginyl-Glycin-Bindung mit Hydroxylamin wurde schon 1969 angewendet /8/, sie ist sehr

spezifisch, verläuft jedoch nicht vollständig. Nur selten wird auch ein kleiner Teil anderer Aminosäurenverbindungen gespalten, Asparaginyll-Leucin /5/ und Asparaginyll-Alanin /73/. Die Höhe der Spaltungsausbeute liegt bei etwa 50 % /4/ oder niedriger. In Abbildung 4.16 ist die Spaltung eines solchen Peptids dargestellt.

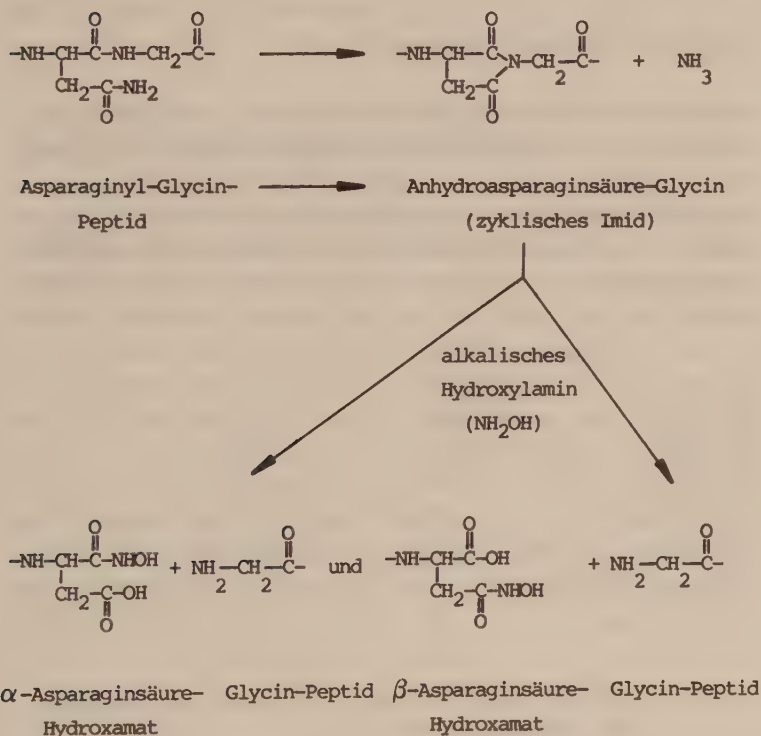


Abb. 4.16: Spaltungsreaktion eines Asparaginyll-Glycin-Peptids mit Hydroxylamin.

Die Hydroxylaminspaltung sollte bei Peptid T_4 und T_8 angewendet werden. Zur Überprüfung der Spaltungsmethode wurde die Hydroxylaminspaltung zuvor an der bekannten Sequenz der Rinder-Cu-Zn-SOD, welche an Position 90-91 eine Asparaginyl-Glycin-Bindung besitzt, angewendet. Die bei der Hydroxylaminspaltung verwendete Methode (Abschnitt 3.8.4) wurde zur Ermittlung der Aminosäuresequenz der Rinder-Cu-Zn-SOD eingesetzt /73/.

Hydroxylaminspaltung der Rinder-Cu-Zn-SOD

Zur Bereitung spaltbarer Substanz wurde die Rinder-Cu-Zn-SOD reduziert und S-carboxymethyliert (Abschnitt 3.4). Ein Teil der Substanz wurde mit Trypsin gespalten (Abschnitt 3.8.2) und die Spaltpeptide aufgetrennt (Abschnitt 3.9.2). Das Peptid T_{10-11} , welches die Asparaginyl-Glycin-Bindung besitzt, wurde identifiziert (Abschnitt 3.5) und separiert. 100 nmol der Rinder-Cu-Zn-

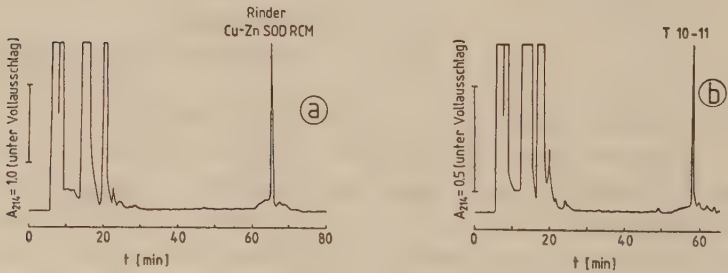


Abb. 4.17: Trennung der Substanzen mit RP HPLC nach Anwendung der Hydroxylaminspaltung
a) bei Rinder-Cu-Zn-SOD (RCM = reduziert, S-carboxymethyliert)
b) bei Peptid T_{10-11} der Rinder-Cu-Zn-SOD (RCM)
Die Peaks am Anfang der chromatographischen Läufe stammen von Substanzen, welche zur Spaltung verwendet wurden.

SOD und 100 nmol des Peptids T₁₀₋₁₁ wurden für die Hydroxylaminspaltung verwendet (Abschnitt 3.8.4). Nach der Inkubationszeit wurden mehrmals jeweils 10 nmol der Reaktionslösungen mit RP HPLC aufgetrennt (Abschnitt 3.9.2). Abbildung 4.17 a und b zeigen jeweils ein HPLC-Chromatogramm der Reaktionslösung der Rinder-Cu-Zn-SOD und ihres Peptids T₁₀₋₁₁. Von den Substanzen der Peaks wurden Aminosäureanalysen angefertigt. Die Analysen zeigen, daß auch ungespaltene Substanz der Rinder-Cu-Zn-SOD und des Peptids T₁₀₋₁₁ vorliegt. Die Hydroxylaminspaltung wurde daraufhin bei der Hefe-Cu-Zn-SOD nicht angewendet.

4.2.6 Primärstruktur der Hefe-Cu-Zn-SOD

Die Abbildung 4.18 zeigt die ermittelte Primärstruktur der Hefe-Cu-Zn-SOD. Die eingezeichneten sequenzierten Peptide geben einen Überblick über die Sequenzierungsstrategie. Die in Klammern angegebenen Aminosäuren wurden durch ihr Verhalten bei der Sequenzanalyse belegt (Abschnitt 4.2.4). Bei Peptid T₄ und T₄₋₅ wurden die Aminosäuren des C-Terminus in dieser Arbeit lediglich aus der Aminosäureanalyse bestimmt. Die Sequenz wurde aus Ref. /33,71/ übernommen (vgl. Abschnitt 5.2). Um dieses anzudeuten, wurde sie in der Abbildung in Klammern eingetragen. Bei der Hefe-SOD wurden eine Asparaginsäure und sechs Histidine, welche Liganden der Kupfer- und Zinkionen sind, an homologen Positionen wie bei der Rinder-Cu-Zn-SOD gefunden: Asp⁸³, His⁴⁶, His⁴⁸, His⁶³, His⁷¹, His⁸⁰ und His¹²⁰.

5. DISKUSSION

5.1 Schweine-Cu-Zn-SOD

In der vorliegenden Arbeit wurde die vollständige Sequenz der Cu-Zn-SOD des Schweines (*Sus scrofa domesticus*) ermittelt. Um die gefundene Sequenz zuverlässig zu bestätigen, wurden die meisten Positionen zweimal oder sogar dreimal mit überlappenden Spaltpeptiden bewiesen. Alle Kupfer- und Zinkliganden, eine Asparaginsäure und sechs Histidine, wurden an homologen Positionen, wie bei allen Cu-Zn-Superoxid-Dismutasen, gefunden (Abb. 5.1).

Im allgemeinen erweist sich die Schweine-Cu-Zn-SOD nicht als besonders ungewöhnlich. Sie weist eine für Cu-Zn-Superoxid-Dismutasen übliche enzymatische Aktivität auf (Abschnitt 4.1.1). Der mit dem Cytochrom-C-Reduktionstest ermittelte Wert ist etwa 20 % geringer als der entsprechende Wert für die Rinder-Cu-Zn-SOD /73/. Der Quotient aus beiden Werten entspricht also innerhalb der Meßgenauigkeit dem Wert der relativen enzymatischen Aktivität, welcher mit dem Pyrogalloltest (Abschnitt 4.1.1) ermittelt wurde. Die Schweine-Cu-Zn-SOD zeigt das für die Klasse der Cu-Zn-Superoxid-Dismutasen charakteristische UV-Absorptionsspektrum. Wie auch die anderen Cu-Zn-Superoxid-Dismutasen, besitzt die Schweine-Cu-Zn-SOD einen niedrigen Gehalt an Tyrosin /46,54/.

Das Bromcyan-Peptid CB₂ wurde vollständig bis zum C-Terminus sequenziert, welcher zusätzlich mit der C-terminalen Sequenzanalyse überprüft und bestätigt wurde. Die tryptische Spaltung wurde nicht vollständig durchgeführt, um größere, überlappende tryptische Peptide zu erhalten. Alle in Abbildung 4.12 dargestellten T-Peptide außer dreien wurden sequenziert. Diese drei T-Peptide wurden mit der Aminosäurenanalyse identifiziert und mit Hilfe von überlappenden Bruchstücken in die Sequenz eingeordnet. Bei der Spaltung mit *Staphylokokkus aureus* Proteinase V8 wurden alle in Abbildung 4.12 eingezeichneten E-Peptide sequenziert. Da bei dieser Spaltung spezifisch Peptidbindungen auf der C-terminalen

	1	20
Mensch	Ac-A	T K A V C V L K G D G P V Q G T I I N F F E Q K E S N G P
Schwein	Ac-A	T K A V C V L K G D G P V Q G T I I N F F E L K G E K - T
Rind	Ac-A	T K A V C V L K G D G P V Q G T I I H F F E A K K G D - T
Pferd	Ac-A	L K A V C V L K G D G P V H G T I I H F F E Q Q Q E G G -
Ratte	Ac-A	M K A V C V L K G D G P V Q G T I I H F F E Q K A S G E P A
Schwertfisch	V	L K A V C V L R G A G E T T G T V Y F F E Q E G N A N A
Fruchtfliege	V	K A V C V I N G S A G E K G T V F F E Q E S S G T - P
Kohl	A	K G V A V L N S S E G V K G T T I F F T H E G N G - A
Hefe	V	Q A V A V L K D A G V S G V V K F E Q K A S E S E P
P. leiognathi	Q	D L T V K M T T L G T G K P V G T I E L S Q N K Y

	40										+		+																
Mensch	V	K	V	W	G	S	I	K	G	-	L	T	E	G	L	H	C	F	H	V	H	E	F	F	D	N	T	A	Q
Schwein	V	L	V	T	G	T	I	K	G	-	L	A	E	G	D	H	G	F	H	V	H	E	F	F	D	N	T	Q	
Rind	V	V	V	T	G	S	I	T	G	-	L	T	E	G	D	H	G	F	H	V	H	E	F	F	D	N	T	Q	
Pferd	V	V	L	K	G	F	I	E	G	-	L	T	K	G	D	H	G	F	H	V	H	E	F	F	D	N	T	Q	
Ratte	V	V	V	G	S	I	T	G	-	L	T	E	G	E	H	G	F	H	V	H	E	F	F	D	N	T	Q		
Schwertfisch	V	V	K	G	I	L	K	G	-	L	T	P	G	E	H	G	F	H	V	H	E	F	F	D	N	T	N		
Fruchtfliege	V	K	V	S	G	E	V	S	G	-	L	A	K	G	L	H	G	F	H	V	H	E	F	F	D	N	T	N	
Kohl	T	T	V	T	G	T	V	C	G	-	L	R	P	G	L	H	G	F	H	V	H	E	F	F	D	N	T	N	
Hefe	T	T	V	S	Y	E	I	A	G	N	S	P	N	A	E	H	G	F	H	V	H	E	F	F	D	N	T	N	
P. leiognathi	V	V	F	T	P	E	L	A	D	-	L	T	P	M	A	H	G	F	H	I	H	O	N	G	-	-	-	-	

	60												+												80											
Mensch	G	C	T	S	-	-	-	-	-	-	-	-	A	G	P	H	F	N	P	-	L	S	R	K												
Schwein	G	C	T	S	-	-	-	-	-	-	-	-	A	G	P	H	F	N	P	-	L	S	R	K												
Rind	G	C	T	S	-	-	-	-	-	-	-	-	A	G	P	H	F	N	P	-	L	S	R	K												
Pferd	G	C	T	T	-	-	-	-	-	-	-	-	A	G	P	H	F	N	P	-	L	S	R	K												
Ratte	G	C	T	T	-	-	-	-	-	-	-	-	A	G	P	H	F	N	P	-	L	S	R	K												
Schwertfisch	G	C	I	S	-	-	-	-	-	-	-	-	A	G	P	H	F	N	P	-	A	S	K	K												
Fruchtfliege	G	C	M	S	-	-	-	-	-	-	-	-	T	G	P	H	F	N	P	-	Y	G	K	E												
Kohl	G	C	M	S	-	-	-	-	-	-	-	-	T	G	P	H	F	N	P	-	D	G	K	T												
Hefe	G	C	V	S	-	-	-	-	-	-	-	-	A	G	P	H	F	N	P	-	F	K	K	T												
P. leiognathi	S	C	A	S	E	K	D	G	K	V	V	L	G	A	A	G	G	H	Y	D	P	E	H	T												

	+				+				+				100																
Mensch	H	G	G	P	K	D	E	E	R	H	V	G	D	L	G	N	V	T	A	D	K	D	G	V	A	D	V	S	
Schwein	H	G	G	P	K	D	Q	E	R	H	V	G	D	L	G	N	V	T	A	G	K	D	G	V	A	T	V	Y	
Rind	H	G	G	P	K	D	E	E	R	H	V	G	D	L	G	N	V	T	A	D	K	D	G	V	A	I	V	D	
Pferd	H	G	G	P	K	D	E	E	R	H	V	G	D	L	G	N	V	T	A	D	E	N	G	K	A	D	V	D	
Ratte	H	G	G	P	A	D	E	E	R	H	V	G	D	L	G	N	V	A	A	G	K	D	G	V	A	I	V	D	
Schwertfisch	H	G	A	G	P	K	D	E	E	R	H	V	G	D	L	G	N	V	T	A	D	A	N	G	V	A	K	I	D
Fruchtfliege	H	G	A	P	V	D	E	N	R	H	L	G	D	L	G	N	I	E	A	T	D	G	D	C	P	T	K	V	N
Kohl	H	G	A	F	P	D	E	A	N	R	H	A	G	D	L	G	N	I	E	I	V	G	D	A	T	A	T	F	T
Hefe	H	G	A	F	T	D	E	V	R	H	V	G	D	M	P	G	N	V	K	T	D	E	N	G	A	I	A	K	S
P. leionognathi	H	G	F	P	W	T	D	D	N	H	K	G	D	L	P	A	L	F	V	S	A	N	G	I	A	T	N	T	

	120												+												140											
Mensch	I	E	D	S	V	I	A	L	S	G	D	H	C	I	I	G	R	T	L	V	V	V	H	H	E	K	A	D	D	L						
Schwein	I	E	D	S	V	I	A	L	S	G	D	H	S	I	I	I	G	R	T	M	V	V	V	H	H	E	K	P	D	D	L					
Rind	I	K	D	P	L	I	S	L	S	G	E	Y	S	I	I	I	G	R	T	M	V	V	V	H	H	E	K	P	D	D	L					
Pferd	M	V	D	S	V	I	S	L	S	G	K	H	S	I	I	I	G	R	T	M	V	V	V	H	H	E	K	Q	D	D	L					
Ratte	I	E	D	R	V	I	S	L	S	G	E	H	S	I	I	I	G	R	T	M	V	V	V	H	H	E	K	Q	D	D	L					
Schwertfisch	I	T	D	-	K	I	S	L	T	G	P	Y	S	I	I	I	G	R	T	M	V	V	I	H	E	K	A	D	D	D	L					
Fruchtfliege	I	T	D	S	K	I	T	L	F	G	A	D	S	I	I	I	G	R	T	V	V	V	V	H	A	D	P	D	D	D	L					
Kohl	I	T	D	S	Q	I	P	L	S	G	P	N	S	I	V	I	G	R	A	I	V	V	V	H	A	D	P	D	D	D	L					
Hefe	F	K	D	S	L	K	L	K	I	G	P	T	S	V	L	G	H	A	I	V	I	I	H	A	G	G	D	D	D	D	L					
P. leioognathi	V	L	A	P	R	L	T	L	K	-	-	E	L	K	G	H	A	I	M	I	H	A	G	G	D	D	D	D	D	D	L					

	160																												
Mensch	G	K	G	G	N	E	E	S	T	K	T	G	N	A	G	S	R	R	L	A	C	G	V	I	G	I	A	Q	
Schwein	G	R	G	G	N	E	E	S	T	K	T	G	N	A	G	S	R	R	L	A	C	G	V	I	G	I	T	Q	
Rind	G	R	G	G	N	E	E	S	T	K	T	G	N	A	G	S	R	R	L	A	C	G	V	I	G	I	A	Q	
Pferd	G	K	G	G	N	E	E	S	T	K	T	G	N	A	G	S	R	R	L	A	C	G	V	I	G	I	A	P	
Ratte	G	K	G	G	N	E	E	S	T	K	T	G	N	A	G	S	R	R	L	A	C	G	V	I	G	I	A	Q	
Schwertfisch	G	R	G	G	N	E	E	S	L	K	T	G	N	A	G	S	R	R	L	A	C	G	V	I	G	T	E	-	
Fruchtfliege	G	Q	G	G	H	E	L	S	L	S	T	G	N	A	G	A	R	P	R	V	A	C	G	V	I	G	I	A	Q
Kohl	G	K	G	G	H	E	L	S	L	S	T	G	N	A	G	A	R	P	R	V	A	C	G	V	I	G	L	Q	G
Hefe	G	K	G	D	T	E	E	S	L	K	T	G	N	A	G	P	R	P	R	V	A	C	G	V	I	G	L	T	N
P. leiognathi	-	-	-	-	S	D	M	P	K	A	L	G	G	G	G	A	R	P	R	V	A	C	G	V	I	G	L	T	N

Abb. 5.1:

Vergleich der bisher bekannten Sequenzen der Cu-Zn-SOD von 10 Spezies. Die gewählte Darstellung ergibt eine maximale Homologie der Sequenzen. Gleiche Aminosäuren an homologen Positionen bei allen Sequenzen sind eingerahmt. (+) kennzeichnet die vermutlich Cu und Zn bindenden Aminosäuren.

Seite von Glutaminsäure und nicht von Glutamin gespalten werden /31/, konnte die Aminosäure an Position 31 des Peptids T₆ eindeutig als Glutaminsäure identifiziert werden (vgl. Abschnitt 4.1.6). Die ermittelten Sequenzen der E-Peptide, welche die tryptischen überlappen, erlaubten die Bestimmung aller Verbindungen der Spaltpeptide in der Sequenz der Schweine-Cu-Zn-SOD bis auf eine T₁-T₂-Verbindung der tryptischen Spaltung.

An Position 29 der Schweine-Cu-Zn-SOD wurden sowohl die Aminosäure Leucin als auch Valin festgestellt (Abschnitt 4.1.6). Zur Erklärung könnte man annehmen, daß zwei verschiedene Cu-Zn-Superoxid-Dismutasen in einem Tier vorhanden sind. Das Auftreten von Leucin und Valin an Position 29 könnte als eine unabhängige Punktmutation an verdoppelten Genen gedeutet werden, wie das z.B. von der Hämoglobinfamilie bekannt ist. An ihrem während der Phylogenese verdoppelten genetischen Material wurden zahlreiche Punktmutationen gefunden /32/. Die Sichelzellanämie (Drepanocytose) ist eines der bekanntesten Beispiele. Ursächlich für dieses Krankheitsbild ist der Aminosäureaustausch nur einer Aminosäure an der 6. Position der β -Kette. Dort ist Glutaminsäure gegen Valin ausgetauscht /7/. Unterstützt wird diese Möglichkeit durch das Auftreten von zwei verschiedenen Messenger-Ribonukleinsäuren in humaner Gewebekultur, welche die Cu-Zn-SOD kodieren /41/. Kürzlich wurde jedoch gezeigt, daß die beiden Messenger Ribonukleinsäuren durch Transkription von einem Gen entstehen /64/. Man muß also annehmen, daß die Cu-Zn-SOD nur von einem Gen kodiert wird.

Die Heterogenität an Position 29 wird am besten durch das Vorkommen der SOD von genetisch heterogenen Schweinen, Allotypen, im gepoolten Blut erklärt. Diese Möglichkeit wird dadurch bekräftigt, daß das gepoolte Blut von drei Schweinen stammte. Das Auftreten von 30 % Valin und 70 % Leucin bei Position 29 könnte damit erklärt werden, daß bei einem der Schweine eine Punktmutation vorlag. Der Austausch der Aminosäure Leucin gegen das chemisch ähnliche hydrophobe Valin wäre durch Änderung der dritten

Base des Basentripletts, welches die Aminosäure kodiert, erreichbar /81/. Die SOD des Blutes eines Schweines, welche mit der gleichen Methode gewonnen und untersucht wurde, wies zu 100 % Leucin an dieser Stelle aus. Der Schluß auf das generelle Vorkommen dieser Allotypie wäre voreilig, da nur die SOD von vier Tieren untersucht wurde.

5.2 Hefe-Cu-Zn-SOD

Mit dieser Arbeit konnte die vollständige Sequenz der Cu-Zn-SOD von Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*), welche von J.T. JOHANSEN et al. /33/ ermittelt wurde, bestätigt werden. Die Autoren fanden an den Positionen 55 und 92 die Aminosäure Asparagin, während in einer Arbeit von H.M. STEINMAN /71/ an diesen Positionen Asparaginsäure genannt wird. Wie bei allen anderen sequenzierten Cu-Zn-Superoxid-Dismutasen wurden die Kupfer- und Zinkliganden, eine Asparaginsäure und sechs Histidine an homologen Positionen gefunden (Abb. 5.1).

Zur Ermittlung der Sequenz von Hefe-Cu-Zn-SOD wurde eine tryptische Spaltung durchgeführt. Die Sequenz von allen Peptiden, bis auf diejenige von Peptid T₄ und T₄₋₅, konnte eindeutig ermittelt werden (vgl. Abschnitt 4.2.4). Die Position jedes Peptids und die Sequenz der C-terminalen Aminosäuren der Peptide T₄ und T₄₋₅, dessen Komposition aus der Aminosäurenanalyse eindeutig bewiesen war (vgl. Abschnitt 4.2.4), wurde durch Vergleich mit bereits bekannten Sequenzen der Hefe-Cu-Zn-SOD /33,71/ gewonnen. An Position 55 und 92 wurden in kleinen Mengen Asparagin und Asparaginsäure festgestellt. Da sich bei der Sequenzanalyse Asparagin zu Asparaginsäure umwandeln kann, aber nicht umgekehrt, wird angenommen, daß primär die Aminosäure Asparagin an diesen Positionen vorlag. Die gefundenen Mengen Asparaginsäure werden als Umwandlungsprodukt des ursprünglich vorhandenen Asparagins gedeutet. Die geringen nachweisbaren Mengen beider Aminosäuren und die Tatsache, daß auf ihre Positionen die Aminosäure Glycin folgt,

sprechen zusätzlich für das Auftreten von Asparagin an diesen Positionen. Bei dieser Aminosäurenkombination Asparaginyl-Glycin wird oft von dem partiellen Verlust der nachzuweisenden Aminosäuren berichtet /4,6,29/. Da die übrige ermittelte Sequenz der tryptischen Peptide sich mit den bereits bekannten Sequenzen der Hefe-Cu-Zn-SOD deckt /33,71/, wurden keine zusätzlichen Spaltungen durchgeführt, um überlappende Peptide zu sequenzieren.

5.3 Phylogenetische Betrachtung

Die molekulare Evolution schreitet wie die bekanntere makroskopische Evolution fort. Die Molekularanatomie bietet sich daher zur Untersuchung der Familienverwandtschaft der lebenden Organismen an. Verallgemeinernd darf der Nachweis von Homologien als Beleg für gemeinsame phylogenetische Vorfahren gelten /81/.

Die Cu-Zn-SOD ist eine homologe Klasse von Proteinen /27/, welche bei allen Spezies der höheren Eukaryonten, in grünen Algen, bei Photobakterium leiognathi und bei Caulobacter crescentus gefunden wurde /72/. Sie konnte bis zu den frühen prokaryontischen Formen des Lebens zurückverfolgt werden und muß sich schon in der nur spärlich mit Sauerstoff angereicherten Atmosphäre vor einigen Milliarden Jahren entwickelt haben /18/. Die Superoxid-Dismutasen der Eukaryonten (Wirbeltiere, Insekten, höhere Pflanzen und Hefe) und der Prokaryonten (Bakterien) scheinen einen gemeinsamen Ursprung zu haben und haben sich höchstwahrscheinlich nach dem Übergang zum sauerstoffreichen Leben während der Evolution zu unabhängigen Linien entwickelt /53,67,68/. Abbildung 5.1 zeigt alle bisher bekannten Sequenzen der Cu-Zn-Superoxid-Dismutasen folgender Spezies: Mensch (*Homo sapiens*) /18/, Schwein (*Sus scrofa domestica*) /diese Arbeit/, Rind (*Bos taurus*) /73/, Pferd (*Equus caballus*) /40/, Ratte (*Rattus norvegicus*) /40/, Schwertfisch, Florida (*Xiphias gladius*) /58/, Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) /39/, Kohl (*Brassica oleracea*) /68/, Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) /diese Arbeit,33/ und Photobakterium leiognathi /67/.

Es besteht eindeutige Homologie zwischen den Cu-Zn-Superoxid-Dismutasen der verschiedenen Spezies. Alle Superoxid-Dismutasen sind aus zwei identischen Untereinheiten aufgebaut, welche eine Länge von (152 ± 1) Aminosäuren haben. An 24 Positionen sind bei allen Sequenzen gleiche Aminosäuren vorhanden. Die Konservierung der Aminosäuren an diesen Positionen scheint für die Aktivität der SOD essentiell zu sein. Die Anwesenheit des acetylierten Alanins

Cu-Zn-SOD	Mensch	Schwein	Rind	Pferd	Ratte	Schwertfisch	Fruchtflye	Kohl	Hefe	P. leiognathi
Mensch	(153)									
Schwein	126	(152)								
Rind	125	130*	(151)							
Pferd	123	117*	122	(153)						
Ratte	127	124*	126	124	(153)					
Schwertfisch	103	104	109	103	100	(151)				
Fruchtflye	89	86	86	84	85	84	(151)			
Kohl	80	87	82	77	81	81	87	(151)		
Hefe	84	81	82	87	86	83	77	78	(153)	
P. leiognathi	39	43*	44	42	42	45	40	43	40	(151)

Tab. 5.1:

Anzahl gleicher Aminosäuren an homologen Positionen, ermittelt durch paarweisen Vergleich der Cu-Zn-SOD verschiedener Spezies. Im Kreis ist die jeweilige Sequenzlänge der SOD angegeben. Die Werte wurden für Leucin an Position 29 der Schweine-Cu-Zn-SOD ermittelt. Liegt Valin an dieser Stelle vor, so müssen die mit * gekennzeichneten Zahlenwerte um 1 erhöht werden.

wurde nur bei höheren Wirbeltieren gefunden und ist offenbar ein Privileg dieser Tierarten. Bei allen anderen bisher untersuchten Superoxid-Dismutasen war der N-Terminus nicht acetyliert (vgl. Abb. 5.1). In Tabelle 5.1 sind für alle bisher bekannten Sequenzen die homologen Positionen von jeweils zwei Sequenzen untereinander aufgeführt. Maximal sind 130 Aminosäuren von 152 Aminosäuren zweier Sequenzen homolog.

Cu-Zn-SOD	Mensch	Schwein	Rind	Pferd	Ratte	Schwertfisch	Fruchtlfliege	Kohl	Hefe	P. teiognathi
Mensch		Primaten Säugetiere		278 ± 17		492 ± 33	668 ± 21	700 ± 41	711 ± 33	1239 ± 21
Schwein	27									
Rind	28	22*				Fische Landwirbeltiere	Insekten Wirbeltiere	höhere Pflanzen Tiere	Hefe Tiere	Prokaryonten Eukaryonten
Pferd	30	36*	31							
Ratte	26	29*	27	29						
Schwertfisch	50	49	44	50	53					
Fruchtlfliege	64	66	65	69	68	69				
Kohl	73	65	69	76	72	70	65			
Hefe	70	73	72	67	68	71	77	75		
P. teiognathi	127	123*	122	124	124	121	126	122	126	

Tab. 5.2:

Anzahl der Aminosäurenaustausche an homologen Positionen, ermittelt durch paarweisen Vergleich der Cu-Zn-SOD verschiedener Spezies. Am Kopf der Tabelle sind die Mittelwerte dieser Zahlen und ihre Standardabweichung für Gruppen von Organismen angegeben. Die Werte wurden für Leucin an Position 29 der Schweine-Cu-Zn-SOD ermittelt. Liegt Valin an dieser Stelle vor, so müssen die mit * gekennzeichneten Zahlenwerte um 1 verringert werden.

Die Evolution kann anhand von Mutationen verfolgt werden, indem man festzustellen versucht, wieviele Genänderungen sich bei der divergierenden Entwicklung verschiedener Organismen seit ihrer Trennung von gemeinsamen Vorfahren ereignet haben. Strukturgenänderungen finden ihren Ausdruck in den Aminosäuresequenzen. Die Zahl der Unterschiede in den Aminosäuresequenzen eines bestimmten Proteins bei zwei Spezies kann als Maß für die phylogenetische Entfernung der Spezies gelten. Um phylogenetische Verwandtschaften zu rekonstruieren, sollte den Untersuchungen aber nicht nur ein Protein zugrunde gelegt werden, sondern die molekulare Evolution sollte an mehreren Proteinen verfolgt werden, zumal sich die Evolutionsraten nicht bei allen Proteinen als konstant erweisen.

In Tabelle 5.2 sind die Werte der Aminosäurenunterschiede angegeben, welche durch paarweisen Vergleich der Sequenzen aller bisher bekannten Cu-Zn-Superoxid-Dismutasen erhalten wurden. Sie kennzeichnen den phylogenetischen Abstand zwischen den verschiedenen Spezies. Die Hauptunterschiede der SOD-Sequenzen zwischen wichtigen Gruppen von Organismen sind am Kopf der Tabelle angegeben. Mit Hilfe der Werte in dieser Tabelle konnte ein phylogenetischer Stammbaum konstruiert werden (vgl. Abbildung 5.2). Die Zweige und Verbindungen sind so gezeichnet, daß die Distanz von einer Spezies zurück zur Verbindung und vorwärts zur zweiten Spezies proportional zum Aminosäurenunterschied zwischen den Spezies ist. Von *Photobakterium leiognathi* sind z.B. die Hefe, der Kohl, die Fruchtfliege, der Schwertfisch oder die Säugetiere etwa gleich weit entfernt. Die Säugetiere untereinander besitzen die ähnlichsten SOD-Sequenzen und sind somit einander am nächsten verwandt. Zwischen der SOD-Sequenz von Schwein und Rind bestehen nur 22 Aminosäurenunterschiede. Der phylogenetische Stammbaum, welcher aus der Verwandtschaft der Cu-Zn-Superoxid-Dismutasen abgeleitet wurde, zeigt gute Übereinstimmung mit demjenigen aus der Cytochrom-C-Familie und korrespondiert gut mit der generell angenommenen Verwandtschaft der untersuchten Spezies /11,18,81/. Verdachtsmomente auf atypische Ereignisse der Cu-Zn-Superoxid-Dismutasen ergeben sich aus den Sequenzanalysen nicht /67,68/.

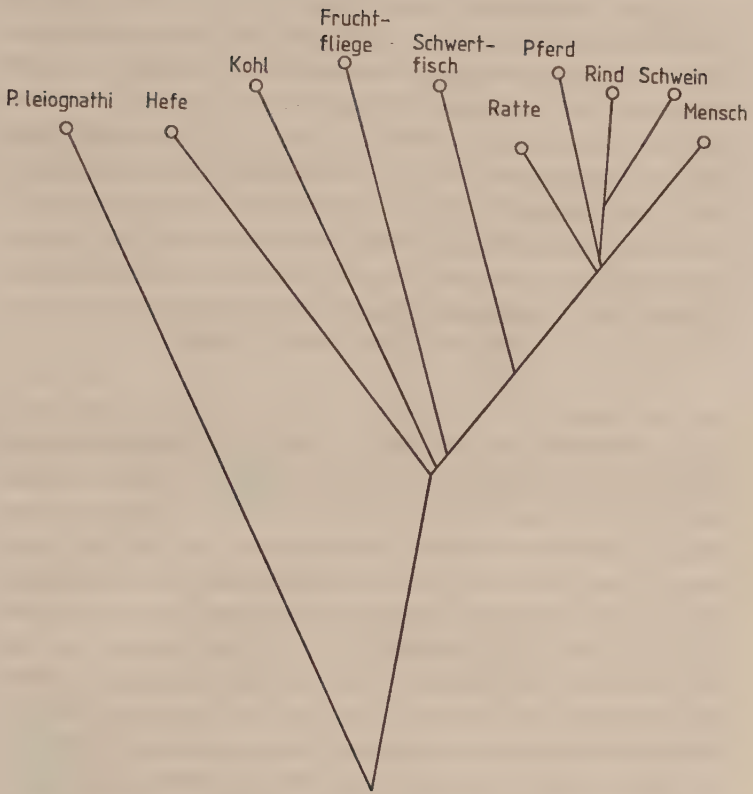


Abb. 5.2: Phylogenetischer Stammbaum, basierend auf der Aminosäuresequenz der Cu-Zn-SOD. Die Länge der Verbindungslinien zwischen den Spezies entspricht der Anzahl der Aminosäurenunterschiede zwischen den Sequenzen.

In Abbildung 5.3 ist die Zahl der Aminosäurenaustausche pro 100 Aminosäuren gegen die Zeit seit der Divergenz bestimmter Organismengruppen aufgetragen. Die Werte wurden mit Hilfe der für die jeweiligen Organismengruppen festgestellten Aminosäurenaustausche, welche in Tabelle 5.2 angegeben sind, errechnet und auf einen Wert pro 100 Aminosäuren umgerechnet (vgl. Tab. 5.3). Für wiederholt auftretende Mutationen wurde nicht korrigiert. Nach Abb. 5.3 ist offenbar die Zahl der Aminosäurenaustausche in neuerer Zeit bei der Evolution der Säugetiere, Fische und Insekten größer als zu früheren Zeiten. Die Mutationen pro Zeiteinheit scheinen bei phylogenetisch jüngeren Organismen im Gegensatz zu älteren, wie z.B. höheren Pflanzen (Kohl), Hefe und Bakterien (*Photobakterium leiognathi*), zugenommen zu haben.

Die funktionelle Struktur eines Enzyms läßt jedoch nicht unbegrenzt Punktmutationen zu. Beim Vergleich der bekannten Aminosäuresequenzen der Cu-Zn-SOD verschiedener Spezies (vgl. Abb. 5.1) findet man 24 Positionen, an denen bei allen Sequenzen homologe Positionen vorliegen. Geht man davon aus, daß die Aminosäuren dieser Positionen für die Aktivität der Cu-Zn-SOD essentiell sind und die Mutation dieser Aminosäuren ein Letalfaktor wäre, so können solche Mutanten nicht gefunden werden. Für eine Abschätzung des Verwandtschaftsgrades von Spezies durch Mutationsstatistik sind demnach primär die funktionell irrelevanten Aminosäuren-Reste heranzuziehen. Um diesem Gesichtspunkt Rechnung zu tragen, wurden die 24 konservierten Aminosäuren von der Zahl der verglichenen Positionen subtrahiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.4 angegeben. Für *Photobakterium leiognathi* wurden die Aminosäuren von Position 61 bis 72, welche in den anderen bekannten Sequenzen nicht vorhanden sind (Abb. 5.1), von der Zahl der bei *Photobakterium leiognathi* verglichenen Positionen subtrahiert und gegenüber den anderen Sequenzen als eine Mutation (1 Aminosäurenaustausch) gewertet.

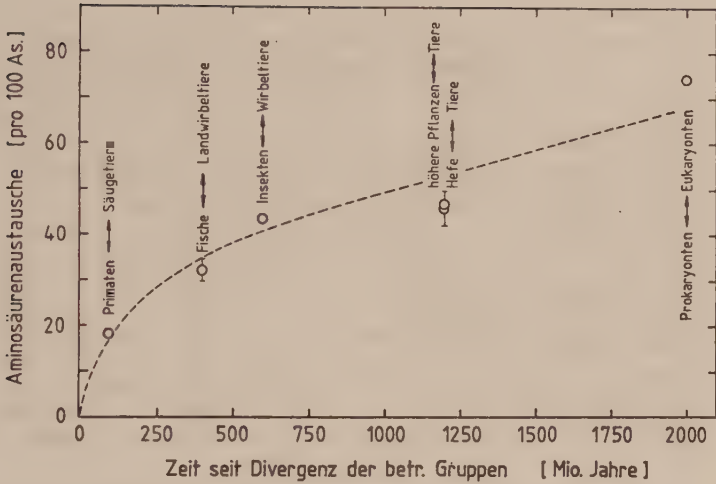


Abb. 5.3: Auftragung der Aminosäurenaustausche pro 100 Aminosäuren gegen die Zeit seit Divergenz der betreffenden Gruppen, die Werte wurden aus Tab. 5.3 entnommen.

	Aminosäuren- austausche	verglichene Positionen	Aminosäuren- austausche pro 100 As.	Mio. Jahre seit Divergenz der Gruppen / 81 /
Primaten gegen Säugetiere	27.8 ± 1.7	153	18.2 ± 1.1	90
Fische gegen Landwirbeltiere	49.2 ± 3.3	153	32.2 ± 2.2	400
Insekten gegen Wirbeltiere	66.8 ± 2.1	153	43.7 ± 1.4	600
höhere Pflanzen gegen Tiere	70.0 ± 4.1	153	45.8 ± 2.7	(1200)
Hefe gegen Tiere	71.1 ± 3.3	154	46.2 ± 2.1	(1200)
Prokaryonten ge- gen Eukaryonten	123.9 ± 2.1	167	74.2 ± 1.3	(2000)

Tab. 5.3: Anzahl der Aminosäurenaustausche für die Organismengruppen der Cu-Zn-SOD (Tab. 5.2), umgerechnet pro 100 Aminosäuren und die Zeiten seit Divergenz der betreffenden Gruppen.

	Aminosäuren- austausche	verglichene Positionen	Aminosäuren- austausche pro 100 As.	Mio. Jahre seit Divergenz der Gruppen / 81 /
Primaten gegen Säugetiere	27.8 ± 17	129	21.6 ± 1.3	90
Fische gegen Landwirbeltiere	49.2 ± 3.3	129	38.1 ± 2.6	400
Insekten gegen Wirbeltiere	66.8 ± 2.1	129	51.8 ± 1.6	600
höhere Pflanzen gegen Tiere	70.0 ± 4.1	129	54.3 ± 3.2	(1200)
Hefe gegen Tiere	71.1 ± 3.3	130	54.7 ± 2.5	(1200)
Prokaryonten ge- gen Eukaryonten	112.9 ± 2.1	131	86.2 ± 1.5	(2000)

Tab. 5.4: Anzahl der Aminosäurenaustausche für die Organismengruppen der Cu-Zn-SOD (Tab. 5.2) und Zeiten seit Divergenz der betreffenden Gruppen. Die Werte wurden wie in Tab. 5.3 pro 100 Aminosäuren umgerechnet, aber vorher für 24 Positionen, welche bei allen Sequenzen homologe Aminosäuren aufweisen, und für die Positionen 61-72 von *P. leiognathi*, korrigiert (siehe Text).

In Abbildung 5.4 ist die entsprechend korrigierte Zahl der Aminosäurenaustausche ähnlich wie in Abb. 5.3 gegen die Zeit seit der Divergenz der betreffenden Organismengruppen aufgetragen. Ein qualitativ anderes Ergebnis bringt die verfeinerte Auswertung der Mutationsereignisse nicht. Wie in Abb. 5.3 ist die Zahl der Mutationen in jüngerer Zeit höher als in früheren Zeiten, die Zunahme der Mutationen in jüngerer Zeit ist jedoch etwas weniger stark ausgeprägt. Diese Zunahme der Mutationen wurde bereits von anderen Autoren festgestellt /39/, dort standen aber lediglich die Sequenzen von fünf Cu-Zn-Superoxid-Dismutasen zur Auswertung zur Verfügung. Es wurde vermutet, daß die Cu-Zn-SOD eine Klasse von Proteinen ist, bei der die Rate der Evolution nicht konstant ist /39/ und offenbar mit der Sauerstoffanreicherung der Atmosphäre zugenommen hat.

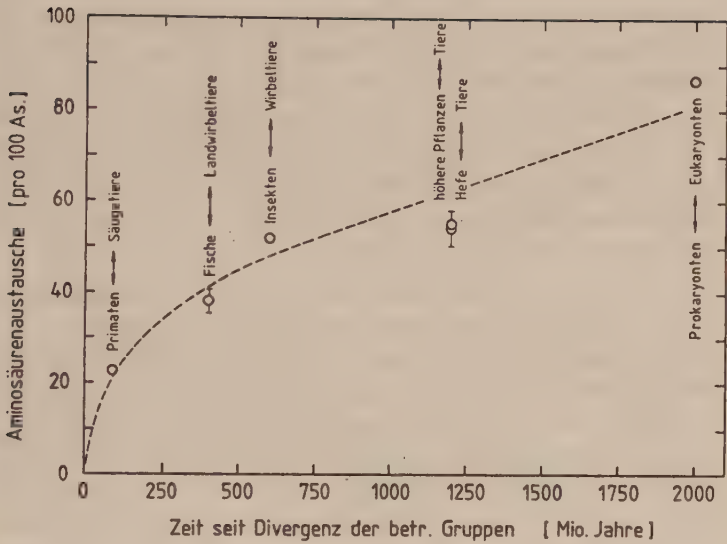


Abb. 5.4: Auftragung der Aminosäurenaustausche pro 100 Aminosäuren gegen die Zeit seit Divergenz der betreffenden Gruppen, die Werte wurden aus Tab. 5.4 entnommen, sie sind wie dort angegeben korrigiert.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die komplette Primärstruktur von Schweine-Cu-Zn-SOD wurde aufgeklärt. Sie ist ein Dimer von identischen Untereinheiten mit einer relativen Molekülmasse von 15800 Da pro Untereinheit. Die Aminosäuresequenz enthält 152 Aminosäuren und hat einen acetylierten N-Terminus. Bei der Cu-Zn-SOD von Schweinen wurde eine Allotypie festgestellt. An Position 29 trat eine Heterogenität bei der SOD vom gepoolten Blut mehrerer Schweine auf, 70 % Leucin und 30 % Valin wurden gefunden. Die SOD aus einem einzigen Tier hingegen erwies sich als homogen.

Die Primärstruktur der Hefe-Cu-Zn-SOD von J.T. JOHANSEN et al. /33/, die sich von derjenigen unterscheidet, die von H.M. STEINMAN gefunden wurde /71/, konnte bestätigt werden. Sie ist ebenfalls ein Dimer identischer Untereinheiten mit einer relativen Molekülmasse von 15721 Da pro Untereinheit, und ihre Aminosäuresequenz enthält 153 Aminosäuren. Der N-Terminus ist im Gegensatz zur Schweine-Cu-Zn-SOD nicht acetyliert.

Die Sequenzermittlung der SOD erfolgte mit automatischer Sequenzanalyse ihrer Spaltpeptide nach Anbindung an eine feste Phase nach dem Prinzip des Edman-Abbaus. Von der reduzierten und S-carboxymethylierten Schweine-Cu-Zn-SOD wurden Bromcyan-Peptide, tryptische Peptide und Peptide aus der Spaltung mit *Staphylokokkus aureus* Proteinase V8 untersucht, von der reduzierten und S-carboxymethylierten Hefe-Cu-Zn-SOD die tryptischen Peptide.

Die Schweine- und Hefe-Cu-Zn-SOD besitzen wie erwartet eine große Zahl von Homologien. An homologen Positionen wurden 81 Aminosäuren gefunden. Die Aminosäuren, welche mit Kupfer und Zink eine Bindung eingehen, eine Asparaginsäure und sechs Histidine, wurden an homologen Positionen wie bei Rinder-Cu-Zn-SOD, gefunden. Die Homologien bei allen bis jetzt bekannten Primärstrukturen der Cu-Zn-SOD konnten paarweise gezeigt werden, und ein phylogenetischer Stammbaum, welcher die phylogenetische Entfernung der Spezies zeigt, wurde erstellt.

6. SUMMARY

Determination of the Primary Structures of Cu-Zn Superoxide Dismutase from Pigs and Yeast - Phylogenetic Comparison of Cu-Zn Superoxide Dismutases from various Organisms

The complete primary structure of porcine Cu-Zn SOD has been determined. It is a dimer of identical subunits with a molecular mass of 15800 Da per subunit. The amino acid sequence comprises 152 amino acid residues, its N-terminus is acetylated. An allotype has been found for porcine Cu-Zn SOD. At position 29 a heterogeneity has been found in the SOD of the pooled blood of several pigs, 70 % of leucine and 30 % of valine have been found. The SOD isolated from a single animal, however, proved to be homogeneous.

The primary structure of Cu-Zn SOD from *Saccharomyces cerevisiae* determined by J.T. JOHANSEN et al. /33/, which differs from that found by H.M. STEINMAN /71/, was verified. It is a dimer of identical subunits with a theoretical molecular mass of 15721 Da per subunit and its sequence comprises 153 amino acid residues. Its N-terminus is, in contrast to porcine Cu-Zn SOD, not acetylated.

The amino acid sequences were determined by an automated Edman degradation using a solid phase sequencer. The reduced S-carboxymethylated porcine Cu-Zn SOD was cleaved with cyanogen bromide, purified trypsin and *Staphylococcus aureus* Proteinase V8. The reduced S-carboxymethylated Cu-Zn SOD from *Saccharomyces cerevisiae* was cleaved tryptically.

As could be expected there is a large number of homologies between porcine Cu-Zn SOD and Cu-Zn SOD from *Saccharomyces cerevisiae*. 81 amino acid residues were found at homologous positions. The amino acids (1 Asp and 6 His) binding Cu and Zn were found at positions homologous to bovine Cu-Zn SOD. Homologies between the primary structures of all Cu-Zn SODs known up to now are shown. A phylogenetic tree showing the phylogenetic distance between the species under consideration, was derived from the degree of sequence homologies.

LITERATURVERZEICHNIS

- /1/ Asada, K., Kanematsu, S., Okaka, S. und Hayakawa, T.:
Phylogenetic Distribution of three Types of Superoxide Dismutase in Organisms
In Chemical and Biochemical Aspects of Superoxide and Superoxide Dismutase (Bannister, J.V. und Hill, H.A.O., Hrsg.)
pp. 136-153, Elsevier North Holland, New York (1980)
- /2/ Biotronik, Applikationsreport ASA 981/2, München (1981)
- /3/ Borejdo, J. und Flynn, C.:
Electrophoresis in the Presence of Coomassie Brilliant Blue R-250 Stains: Polyacrylamide Gels During Protein Fractionation
Anal. Biochem. 140, 84-86 (1984)
- /4/ Bornstein, P.:
Structure of $\alpha 1$ -CB8, a Large Cyanogen Bromide Produced Fragment from the $\alpha 1$ Chain of Rat Collagen. The Nature of a Hydroxylamine-Sensitive Bond and Comparison of Tryptic Peptides
Biochemistry Easton Pa. 9, 2408-2421 (1970)
- /5/ Bornstein, P. und Balian, G.:
The Specific Nonenzymatic Cleavage of Bovine Ribonuclease with Hydroxylamine
J. Biol. Chem. 245, 4854-4856 (1970)
- /6/ Bornstein, P. und Balian, G.:
Cleavage at Asn-Gly Bonds with Hydroxylamine
Methods Enzymol. 47, 132-145 (1977)
- /7/ Buddecke, E.:
Grundriß der Biochemie
Walter de Gruyter, Berlin (1977)
- /8/ Butler, W.T.:
The Identity of a Hydroxylamine-Sensitive Bond in the $\alpha 1$ Chain of Rat Skin Collagen
J. Biol. Chem. 244, 3415-3422 (1969)

- /9/ Carrico, R.J. und Deutsch, H.F.:
Isolation of Human Hepatocuprein and Cerebrocuprein, Their
Identity with Erythrocuprein
J. Biol. Chem. 244, 6087-6093 (1969)
- /10/ Crestfield, A.M., Moore, S. und Stein, W.H.:
The Preparation and Enzymatic Hydrolysis of Reduced and
S-Carboxymethylated Proteins
J. Biol. Chem. 238, 622-627 (1963)
- /11/ Dayhoff, M.O.:
In Atlas of Protein Sequence and Structure, Vol. 5, Suppl. 2,
pp.25-35, Natl. Biomed. Res. Found. Washington, D.C. (1976)
- /12/ Drapeau, G.R., Boily, Y. und Houmard, J.:
Purification and Properties of an Extracellular Protease of
Staphylococcus aureus
J. Biol. Chem. 247, 6720-6726 (1972)
- /13/ Edman, P.:
Method for Determination of the Amino Acid Sequence in
Peptides
Acta Chem. Scand. 4, 283-293 (1950)
- /14/ Edman, P.:
In Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics (Neele-
mann, S.B., Hrsg.) Bd. VIII, pp. 214-226 (1975)
- /15/ Edman, P. und Begg, G.:
A Protein Sequenator
Eur. J. Biochem. 1, 80-81 (1967)
- /16/ Evans, H.J., Steinman, H.M. und Hill, R.L.:
Bovine Erythrocyte Superoxide Dismutase: Isolation and
Characterization of Tryptic, Cyanogen Bromide, and
Maleylated Tryptic Peptides
J. Biol. Chem. 249, 7315-7325 (1974)
- /17/ Flohé, L., Giertz, H. und Beckmann, R.:
Free Radical Scavengers as Anti-Inflammatory Drugs?
In Handbook of Inflammation (Bonta, I.L., Bray, M.A. und
Parnham, M.J., Hrsg.), vol. 5, pp.255-281, Elsevier, Amster-
dam (1985)

- /18/ Flohé, L., Günzler, W.A., Kim, S-M.A., Ötting, F. und Steffens, G-J.:
The Phylogenetic Position of *P. leiognathi*
In Oxygen Radicals in Chemistry and Biology (Bors, W., Saran, M. und Tait, D., Hrsg.), pp. 793-801,
Walter de Gruyter & Co., Berlin (1984)
- /19/ Flohé, L. und Loschen, G.:
Sauerstoffradikale als Entzündungsmediatoren
In Superoxid-Dismutase - Biochemie und therapeutischer Einsatz
(Puhl, W. und Sies, H., Hrsg.), pp. 35-51, Perimed Fachbuch-
Verlagsgesellschaft mbH, Erlangen (1982)
- /20/ Flohé, L. und Ötting, F.:
Superoxide Dismutase Assays
Methods Enzymol. 105, 93-104 (1984)
- /21/ Forman, H.J. und Fridovich, I.:
Superoxide Dismutase: A Comparison of Rate Constants
Arch. Biochem. Biophys. 158, 396-400 (1973)
- /22/ Fridovich, I.:
Superoxide Dismutases
Annu. Rev. Biochem. 44, 147-157 (1975)
- /23/ Fridovich, I.:
Superoxide Radical: An Endogenous Toxicant
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 23, 239-257 (1983)
- /24/ Grigoryan und Nalbandyan.:
Superoxide Dismutase from Chromaffin Granules
In Chemical and Biochemical Aspects of Superoxide and
Superoxide Dismutase (Bannister, J.V. und Hill, H.A.O.,
Hrsg.) pp. 196-200, Elsevier, North-Holland (1980)
- /25/ Gross, E. und Witkop, B.:
Specific Cleavage of Methionyl Peptides
J. Am. Chem. Soc. 83, 1510-1511 (1969)
- /26/ Harris, J.I., Auffret, A.D., Northrop, F.D. und Walker, J.E.:
Structural Comparisons of Superoxide Dismutases
Eur. J. Biochem. 106, 297-303 (1980)

- /27/ Harris, J.I. und Steinman, H.M.:
Amino Acid Sequence Homologies Among Superoxide Dismutases
In Superoxide and Superoxide Dismutase (Michelson, A.M.,
McCord, J.M. und Fridovich, I., Hrsg.) pp. 225-230 Academic
Press, London (1977)
- /28/ Hering, K., Kim, S-M.A., Michelson, A.M., Ötting, F., Puget, K.,
Steffens, G.J. und Flohé, L.:
The Primary Structure of Porcine Cu-Zn Superoxide Dismutase:
Evidence for Allotypes of Superoxide Dismutase in Pigs
Biol. Chem. Hoppe-Seyler 366 435-445 (1985)
- /29/ Hermodson, M.A.:
Chemical Cleavage of Proteins
In Methods in Protein Sequence Analysis (Elzinga, M., Hrsg.)
pp. 316-317, Humana Press, Clifton, New Jersey (1982)
- /30/ Hirs, C.H.W.:
Detection of Peptides by Chemical Methods
Methods Enzymol. 11, 325-329 (1967)
- /31/ Hounard, J. und Drapeau, G.R.:
Staphylococcal Protease: A Proteolytic Enzyme Specific for
Glutamoyl Bonds
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, pp. 3506-3509 (1972)
- /32/ Hunt, L.T.; Sochard, M.R. und Dayhoff, M.O.:
Globins
In Atlas of Protein Sequence & Structure (Dayhoff, M.O.,
Hrsg.) Vol. 5, pp. 67-87., Natl. Biomed. Res. Found.,
Washington, D.C. (1972)
- /33/ Johansen, J.T., Overballe-Petersen, C., Martin, B., Hasemann, V.
und Svendsen, I.:
The Complete Amino Acid Sequence of Copper, Zinc Superoxide
Dismutase from *Saccharomyces cerevisiae*
Carlsberg Res. Commun. 44, 201-217 (1979)

- /34/ Kappus, H.:
Toxizität von Sauerstoffradikalen - Biologische Funktion und
schädliche Wirkung auf das Gewebe
In Superoxid-Dismutase - Biochemie und therapeutischer Einsatz
(Puhl, W. und Sies, H., Hrsg.), pp. 19-25, Perimed Fachbuch-
Verlagsgesellschaft mbH, Erlangen (1982)
- /35/ Keele, B.B., McCord, J.M. und Fridovich, I.:
Superoxid Dismutase from *Escherichia coli* B, a new Mangan-
ese-Containing Enzyme
J. Biol. Chem. 245, 6176-6181 (1970)
- /36/ Kim, S-M.A., Steffens, G.J., Flohé, L., Frankus, E.,
Günzler, W.A. und Ötting, F.:
Peptide Mapping Based on Reversed Phase HPLC as Rapid Iden-
tification of Bovine, Human, and *P. leionathi* Cu/Zn-Super-
oxide Dismutases (SOD)
In 3rd Int. Symposium on HPLC of Proteins, Peptides and
Polynukleotides, Monaco, Abstract No. 512 (1983)
- /37/ Kleinschmidt, T. und Braunitzer, G.:
Über die Primärstruktur eines dimeren Hämoglobins, Erythro-
cruorin, von Insekten
Liebigs Ann. Chem. 1060-1075 (1978)
- /38/ Laemmli, U.K.:
Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the
Head of Bacteriophage T4
Nature 227, 680-685 (1970)
- /39/ Lee, Y.M., Friedman, D.J. und Ayala, F.J.:
Superoxide Dismutase: An Evolutionary Puzzle
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 824-828 (1985)
- /40/ Lerch, K. und Ammer, D.:
Amino Acid Sequence of Copper-Zinc Superoxide Dismutase from
Horse Liver
J. Biol. Chem. 256, 11545-11551 (1981)
- /41/ Lieman-Hurwitz, J., Dafni, N., Lavie, V. und Groner, Y.:
Human Cytoplasmatic Superoxide Dismutase cDNA Clone: A Probe
for Studying the Molecular Biology of Down Syndrome
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 2808-2811 (1982)

- /42/ Mann, T. und Keilin, D.:
Haemocuprein and Hepatocuprein, Copper-Protein Compounds of
Blood and Liver in Mammals
Proc. Roy. Soc. Ser. B. Biol. Sci. London. 126, 303-15 (1939)
- /43/ Marklund, S. und Marklund, G.:
Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase
Eur. J. Biochem. 47, 469-474 (1974)
- /44/ McCord, J.M.:
Oxygen-Derived Free Radicals in Postischemic Tissue Injury
New Engl. J. Med. 312, 159-163 (1985)
- /45/ McCord, J.M., Boyle, J.A., Day, E.D., Rizzolo, L.J. und Salin, M.L.:
A Manganese-Containing Superoxide Dismutase from Human Liver
In Superoxide and Superoxide Dismutase (Michelson, A.M., McCord, J.M. und Fridovich, I., Hrsg.) pp.129-138 (1977)
- /46/ McCord, J.M. und Fridovich, I.:
Superoxide Dismutase, an Enzymic Function for Erythrocuprein (Hemocuprein)
J. Biol. Chem. 244, 6049-6055 (1969)
- /47/ McCord, J.M., Keele, B.B. und Fridovich, I.:
An Enzyme-Based Theory of Obligate Anaerobiosis: The Physiological Function of Superoxide Dismutase
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 68, 1024-1027 (1971)
- /48/ Menander-Huber, K.B. und Huber, W.:
Orgotein, the Drug Version of Bovine Cu-Zn Superoxide Dismutase: A Summary Account of Clinical Trials in Man and Animals
In Superoxide and Superoxide Dismutase (Michelson, A.M., McCord, J.M. und Fridovich, I., Hrsg.) pp. 537-549 Academic Press, London (1977)
- /49/ Mohamed, M.S. und Greenberg, D.M.:
Isolation of Purified Copper Protein from Horse Liver
J. Gen. Physiol. 37, 433-439 (1953)

- /50/ Nohl, H.:
Physiologische und pathophysiologische Bedeutung von Superoxid-Radikalen und die regulatorische Rolle des Enzyms Superoxiddismutase
Klin. Wochenschr. 59, 1081-1091 (1981)
- /51/ Porter, H. und Ainsworth, S.:
The Isolation of the Copper-Containing Protein Cerebrocuprein I from Normal Human Brain
J. Neurochem. Oxford. 5, 91-98 (1959)
- /52/ Porter, H., Folch, J., Beggrovs, J. und Ainsworth, S.:
Cerebrocuprein I. A Copper-Containing Protein Isolated from Brain
J. Neurochem. 1, 260-271 (1957)
- /53/ Puget, K., Lavelle, F. und Michelson, A.M.:
Superoxide Dismutases from Prokaryote Bioluminescent Organisms
In Superoxide and Superoxide Dismutase (Michelson, A.M., McCord, J.M. und Fridovich, I., Hrsg.) pp. 139-150 (1977)
- /54/ Puget, K. und Michelson, A.M.:
Iron Containing Superoxide Dismutases from Luminous Bacteria
Biochimie 56, 1255-1267 (1974)
- /55/ Rabinowitch, H.D. und Fridovich, I.:
Superoxide Radicals, Superoxide Dismutases and Oxygen Toxicity in Plants
Photochem. Photobiol. 37, 679-690 (1983)
- /56/ Richardson, D.C.:
The Three-Dimensional Structure of Cu-Zn SOD
In Superoxide and Superoxide Dismutase (Michelson, A.M., McCord, J.M. und Fridovich, I., Hrsg.) pp. 217-223 (1977)
- /57/ Richardson, J., Thomas, K.A., Rubin, B.H. und Richardson, D.C.:
Crystal Structure of Bovine Cu,Zn Superoxide Dismutase at 3 Å Resolution: Chain Tracing and Metal Ligands
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 1349-1353 (1975)

- /58/ Rocha, H.A., Bannister, W.H. und Bannister, J.V.:
The Amino Acid Sequence of Copper/Zinc Superoxide Dismutase
from Swordfish Liver, Comparison of Copper/Zinc Superoxide
Dismutase Sequences
Eur. J. Biochem. 145, 477-484 (1984)
- /59/ Rolle, M. und Mayr, A.:
Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart (1978)
- /60/ Rotilio, G., Bray, R.C. und Fielden, E.M.:
A Pulse Radiolysis Study of Superoxide Dismutase
Biochim. Biophys. Acta 268, 605-609 (1972)
- /61/ Salnikow, J., Lehmann, A. und Wittmann-Liebold, B.:
Improved Automated Solid-Phase Microsequencing of Peptides
Using DABITC
Anal. Biochem. 117, 433-442 (1981)
- /62/ Shapiro, A.L., Vinuela, E. und Maizel, J.V.:
Molecular Weight Estimation of Polypeptide Chains by
Electrophoresis in SDS-Polyacrylamide Gels
Biophys. Biochem. Res. Commun. 28, 815-820 (1967)
- /63/ Sherman, L., Dafni, N., Lieman-Hurwitz, J., und Groner, Y.:
Nucleotide Sequence and Expression of Human Chromosome 21
Encoded Superoxide Dismutase mRNA
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 5465-5469 (1983)
- /64/ Sherman, L., Levanon, D., Lieman-Hurwitz, J., Dafni, N. und
Groner, Y.:
Human Cu/Zn Superoxide Dismutase Gene: Molecular Character-
ization of its two mRNA Species
Nucleic Acids Res. 12, 9349-9365 (1984)
- /65/ Sies, H.:
Bildung von Superoxidradikalen und Peroxiden im Organismus
In Superoxid-Dismutase - Biochemie und therapeutischer Einsatz
(Puhl, W. und Sies, H., Hrsg.), pp. 11-17, Perimed Fachbuch-
Verlagsgesellschaft mbH, Erlangen (1982)

- /66/ Steffens, G.J. und Buse, G.:
Studien an Cytochrom-C-Oxidase, I: Reinigung und Charakterisierung des Enzyms aus Rinderherzen und Identifizierung der im Komplex enthaltenen Peptidketten
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 1125-1137 (1976)
- /67/ Steffens, G.J., Bannister, J.V., Bannister, W.H., Flohé, L., Günzler, W.A., Kim, S-M.A. und Ötting, F.:
The Primary Structure of Cu-Zn Superoxide Dismutase from Photobacterium leiognathi: Evidence for a Separate Evolution of Cu-Zn Superoxide Dismutase in Bacteria
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 675-690 (1983)
- /68/ Steffens, G.J., Frankus, F., Hering, K., Kim, S-M.A., Ötting, F., Schwertner, E., Puget, K., Michelson, A.M. und Flohé, L.:
Sequencing Confirms Normal Divergent Evolution of Cu/Zn SOD
Fourth International Conference on Superoxide and Superoxide Dismutase, Rome Abstr. P 147 (1985) (in Vorbereitung)
- /69/ Steffens, G.C.M., Steffens, G.J. und Buse, G.:
Studies on Cytochrome c Oxidase, VIII: The Amino Acid Sequence of Polypeptide VII
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 1641-1650 (1979)
- /70/ Steinman, H.I.:
The Amino Acid Sequence of Mangano Superoxide Dismutase from Escherichia coli B
J. Biol. Chem. 253, 8708-8720 (1978)
- /71/ Steinman, H. M.:
The Amino Acid Sequence of Copper-Zinc Superoxide Dismutase from Bakers' Yeast
J. Biol. Chem. 255, 6758-6765 (1980)
- /72/ Steinman, H.M.:
Copper-Zinc Superoxide Dismutase from Caulobacter crescentus CB15, a Novel Bacteriocuprein Form of the Enzyme
J. Biol. Chem. 257, 10283-10293 (1982)
- /73/ Steinman, H.M., Naik, V.R., Albernethy, J.L. und Hill, R.:
Bovine Erythrocyte Superoxide Dismutase: Complete Amino Acid Sequence
J. Biol. Chem. 249, 7326-7338 (1974)

- /74/ Tempel, K., Wulffius-Rock, M., Winkle, J. und Schmerold, I.:
Semikonservative und reparaturbedingte Desoxyribonukleinsäuresynthese in Rattenthymozyten unter dem Einfluß einiger radioprotektiver und radiosensibilisierender Verbindungen Strahlentherapie 158, 112-122 (1982)
- /75/ Titani, K., Sasagawa, T., Resing, K. und Walsh, K.A.:
A Simple and Rapid Purification of Commercial Trypsin and Chymotrypsin by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography
Anal. Biochem. 123, 408-412 (1982)
- /76/ Vance, P.G. und Keele, B.B.:
Superoxide Dismutase from Streptococcus mutans, Isolation and Characterization of two Forms of the Enzyme
J. Biol. Chem. 247, 4782-4786 (1972)
- /77/ Weber, K. und Osborn, M.:
The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
J. Biol. Chem. 244, 4406-4412 (1969)
- /78/ Weisiger, R.A. und Fridovich, I.:
Superoxide Dismutase, Organelle Specificity
J. Biol. Chem. 248, 3582-3592 (1973)
- /79/ White, A., Handler, P., Smith, E.L., Hill, R.L. und Lehman, I.R.:
Principles of Biochemistry
McGraw-Hill Kogakusha LTD. Tokyo (1978)
- /80/ Wilsmann, K.M.:
Ten Years of Clinical Experience with SOD Treatment of Inflammatory Disorders
Fourth International Conference on Superoxide and Superoxide Dismutase, Rome Abstr. L 27 (1985) (in Vorbereitung)
- /81/ Wilson, I. und Osborne, E.:
Life on Earth
Sinauer Associates Inc., Sunderland, USA (1978)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Leopold Flohé, der mir die Durchführung dieser Arbeit im Forschungszentrum der Grünenthal GmbH, Aachen, ermöglichte, und der durch viele Anregungen und durch seine Diskussionsbereitschaft sehr zum Fortgang der Arbeit beigetragen hat.

Herrn Prof. Dr. Karlheinz Tempel, Institut für Pharmakologie, Toxikologie, und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München möchte ich für sein Interesse an dieser Arbeit, für viele nützliche Hinweise und für die Bereitschaft, das Erstreferat zu übernehmen, recht herzlich danken.

Herrn Privatdozent Dr. Gerd-Josef Steffens bin ich sehr zu Dank verpflichtet für die zahlreichen Gespräche und Diskussionen, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen, und für die Hinweise bei der Durchführung der Experimente.

Frau Edeltraud Mertens und Frau Elke Grotenrath möchte ich herzlich für ihre freundliche Hilfe bei der Einarbeitung an den Experimentiereinrichtungen danken.

Allen Mitarbeitern der Firma Grünenthal GmbH danke ich für ihre ständige Hilfsbereitschaft.

Die Sequenzanalyse mit dem Flüssigphasensequenator wurde am Institut für Physiologische Chemie der RWTH Aachen in der Abteilung von Prof. Dr. Gerhard Buse durchgeführt.

Herrn Dr.-Ing. Karl-August Brauchle danke ich für die Bereitstellung eines sehr komfortablen Textverarbeitungssystems zur Erstellung des Manuskripts.

Lebenslauf

Karin Hering	Hasenfeld 20, 5100 Aachen
geboren am	27. September 1959 in Aachen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Beruf des Vaters	Dipl.-Ingenieur
Schulbildung	Grundschule (Mai 1966 bis Juli 1969) Gymnasium (September 1969 bis Juni 1978), Leistungskurse Mathematik, Physik, Kunst Abitur 1978
Studium	11 Semester Tiermedizin an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München November 1978 bis März 1984
Studienabschluß	Tierärztliche Prüfung am 7. März 1984
Approbation	10. Mai 1984 seit November 1984 im Forschungszentrum der Grünenthal GmbH, Aachen, Forschungs- leiter Prof. Dr. L. Flohé, zur Anfertigung der Doktorarbeit

